

Proteinchemische Untersuchungen an F₁-ATPase aus Hefe

Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten und
Sequenzermittlung der γ -Untereinheit

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Bernd Pevce

Bochum 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Proteinchemische Untersuchungen an F_1 -ATPase aus Hefe

Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten und
Sequenzermittlung der γ -Untereinheit

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Bernd Pevec

Bochum 1988

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie in
Dortmund unter der Leitung von Prof. B. Hess angefertigt.

1. Einleitung	1
2. Materialien und Methoden	7
2. 1. Chemikalien	7
2. 2. Instrumentation	8
2. 3. Methoden	9
2. 3. 1. SDS-Gelelektrophorese	9
2. 3. 2. Sequenzierung	10
2. 3. 3. Circular-Dichroismus-Messungen	11
2. 3. 4. Präparation der F_1 -ATPase	12
2. 3. 5. Trennung der F_1 -Untereinheiten	12
2. 3. 6. Carboxymethylierung	13
2. 3. 7. Chemische Spaltungen	13
2. 3. 8. Enzymatische Spaltungen	14
2. 3. 9. Auftrennung der Spaltprodukte	16
3. Resultate	18
3. 1. Reinheitskontrolle der ATPase	18
3. 2. Trennung der Untereinheiten	20
3. 3. Charakterisierung der Untereinheiten	25
3. 3. 1. Molekulargewicht	25
3. 3. 1. 1. Molekulargewichtsbestimmung aus dem SDS-Gel	25
3. 3. 1. 2. Exakte Molekulargewichte der α , β und γ -Untereinheit	26
3. 3. 2. Aminosäurezusammensetzung	26
3. 3. 2. 1. Bestimmung des Tryptophan-Gehalts	26
3. 3. 2. 2. Bestimmung des Methionin-Gehalts	27
3. 3. 2. 3. Aminosäureanalyse	28
3. 3. 3. Isoelektrische Fokussierung	30
3. 3. 4. N-terminale Sequenzen der Untereinheiten	32
3. 3. 5. Circulardichroismus	33
3. 3. 6. Peptidsequenzen der α -Untereinheit	37
3. 3. 7. Sequenzermittlung der γ -Untereinheit	38
3. 3. 7. 1. Methodik der manuellen Sequenzermittlung	38
3. 3. 7. 2. Trennung der proteolytischen Spaltprodukte	40
3. 3. 7. 3. Analyse der tryptischen Spaltung	41
3. 3. 7. 4. Spaltung mit Clostripain	46
3. 3. 7. 5. Spaltung mit S.aureus Protease	48
3. 3. 7. 6. Spaltung an neutralen Aminosäuren	50
3. 3. 7. 7. Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit	55
4. Diskussion	57
4. 1. Methodenkritik	58
4. 2. Heterogenität der ATPase	60
4. 3. Ermittlung der N-Termini der reifen Untereinheiten	63
4. 4. Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten	64
4. 5. Sekundärstrukturvorhersage	66
4. 6. Abschließende Bemerkungen	75
5. Zusammenfassung	77

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Circulardichroismus
DABITC	4'(N,N-dimethylamino)-azobenzol-4-isothiocyanat
EDTA	1,2-Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IBA	o-Jodosobenzoesäure
NEM	N-Ethylmaleimid
PITC	Phenylisothiocyanat
ATZ-	Anilinothiazolidon-
PTC-	Phenylthiocarbamyl-
PTH-	Phenylthiohydantoin-
	} aminosäure
DPTU	N,N'-Diphenylthioharnstoff
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminoethan
TFA	Trifluoressigsäure
TPCK	Tosylphenylalanylchloromethylketon
Tris	1,1,1-Tris-(hydroxymethyl)-2-amino-ethan

Die für die Kennzeichnung der Aminosäuren verwendeten Abkürzungen entsprechen den in der Biochemie üblichen 1- bzw. 3-Buchstabencode.

1. Einleitung

Ein Teil der Energiegewinnung aller photosynthetisch oder aerob lebenden Organismen erfolgt durch die Nutzung eines elektrochemischen Potentials zur Synthese von ATP. Für diesen Prozeß sind zwei Systeme erforderlich, nämlich das Elektronentransportsystem und die H^+ -ATP-Synthetase, die im allgemeinen H^+ -ATPase genannt wird. In einigen Bakterien kann das Elektronentransportsystem zeitweilig umgangen und der benötigte H^+ -Gradient durch die direkte Nutzung der Lichtenergie erzeugt werden, wie es z. B. beim *H. halobium* durch das Bakteriorhodopsin erfolgt (Danon und Stoeckenius, 1974).

Die F_1 -ATPase ist Teil der Protonen-translozierenden ATP-Synthetase, eines ubiquitären Enzymkomplexes, der bereits 1960 gefunden wurde (Pullman et al., 1960) und in seiner Untereinheitenzusammensetzung beschrieben wurde (Kagawa, 1978). Dieses Enzym wurde bisher in allen Arten von Organismen gefunden; in Bakterien (Foster und Fillingame, 1979) ebenso wie in Chloroplasten (Nelson, 1976) und natürlich in Mitochondrien (Ryrie, 1977; Penefsky, 1979), in denen es als Endglied der oxidativen Phosphorylierung den durch die Dehydrogenasen generierten pH -Gradienten und das aufgebaute Membranpotential zur Bildung von ATP aus ADP und Phosphat nutzt (Mitchell, 1961, 1966).

Die H^+ -ATPase besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Teilen: dem transmembranen F_0 -Teil sowie der wasserlöslichen F_1 -ATPase. Der F_0 -Teil ist ein Multiprotein-Komplex aus unterschiedlichen Peptiden, in *E. coli* z. B. aus drei verschiedenen in der Stöchiometrie ab_2c_{10} (Foster und Fillingame, 1982), in Hefe z. B. aus zumindest 7 Peptiden (Covarrubias, 1984). Die Funktion des F_0 -Teils ist unklar; in isolierter Form stellt er einen Protonen-spezifischen Kanal dar, der durch die Assoziation von γ , δ und ϵ vollständig blockiert werden kann (Kagawa, 1978).

Im intakten Enzymkomplex hat die F_1 -ATPase direkten Kontakt mit dem F_0 -Teil (Hoppe und Sebald, 1984), kann jedoch leicht von der Membran getrennt und in wasserlöslicher Form erhalten werden. In isolierter Form ist die F_1 -ATPase nur noch zu

aktiver ATP-Hydrolyse fähig, eine ATP-Synthese erfolgt ausschließlich an enzymgebundenen Nukleotiden (Cross und Boyer, 1975; Gómez Puyou et al., 1986; Feldman und Sigman, 1982). Dieser katalytisch aktive Teil besteht in den meisten bekannten F_1 -ATPasen aus 5 Untereinheiten, die nach abnehmendem Molekulargewicht α , β , γ , δ und ϵ genannt werden.

Über die Funktion von δ und ϵ ist wenig bekannt. Im thermophilen Bakterium PS3 assoziieren sie an den F_0 -Teil (Yoshida et al., 1977) und sind somit offenbar das Bindeglied zwischen dem katalytisch aktiven Teil der F_1 -ATPase und dem Protonenkanal. Ohne diese Peptide erfolgt weder eine Bindung des katalytisch aktiven Komplexes an den F_0 -Teil noch eine aktive ATP-Synthese (Dunn und Heppel, 1981). Sie haben allerdings keinen direkten Einfluß auf den Protonenfluß. Erst durch die Assoziation von γ an einen mit δ und ϵ besetzten F_0 -Teil wird der Protonenfluß blockiert.

Im Gegensatz dazu sind die zwei großen Untereinheiten gut charakterisiert. α (durchschnittliches Molekulargewicht 58 kDa) und β (M ca. 52 kDa) sind die Untereinheiten, an denen die Synthese bzw. Hydrolyse erfolgt. Es sind evolutionär stark konservierte Proteine, deren Primärstrukturen bereits große Homologien aufweisen (ein Strukturvergleich ist bei Walker et al., 1985, gegeben). Sie verfügen über Bindungsstellen für Phosphat (Kasahara und Penefsky, 1978), ADP und ATP bzw. deren Mg-Komplexe (Senior, 1979; Jallon et al., 1977), die sich zudem noch differenzieren lassen (Recktenwald und Hess, 1979). Die α -Untereinheit hat hochaffine Bindungsstellen für ATP und ADP, an denen ein Austausch der Nukleotide praktisch nicht erfolgt, die daher auch am katalytischen Prozess nicht beteiligt sind (Dunn und Heppel, 1981), während β niederaffine, katalytisch aktive Stellen aufweist (Schäfer, 1985; Issartel et al., 1986). Der Primärstrukturvergleich zeigt Stellen, die große Sequenzhomologien zu anderen Nukleotid-bindenden Proteinen aufweisen (Fry et al., 1986).

Untersuchungen indizieren, daß der energieverbrauchende Schritt nicht die Bildung der Anhydridbindung ist, sondern die Loslösung des Nukleotids aus der Bindungsstelle; d.h. die Energie wird benötigt, um eine Konformationsänderung des Enzyms vorzunehmen (Boyer et al., 1973; Penefsky, 1985; Cross et al., 1984).

Die strukturelle Organisation der F_1 -ATPase konnte in letzter Zeit bestimmt werden. Es ist in der Aufsicht ein hexagonal angeordnetes Molekül, wobei die Ecken alternierend von α - und β -Untereinheiten gebildet werden (Tiedge et al., 1983; Akey et al., 1983; Mayer et al., 1986). Trotz dieser strukturellen Symmetrie der α - und β -Untereinheiten ist die F_1 -ATPase während des katalytischen Prozesses unsymmetrisch (Ferguson et al., 1975; Recktenwald und Hess, 1980).

In Abbildung 1 ist das Ergebnis einer Einzelmolekül-Bildanalyse einer elektronenmikroskopischen Aufnahme der F_1 -ATPase dargestellt (Boekema et al., 1986). Dabei befindet sich innerhalb des Moleküls noch ein Zentrum hoher Elektronendichte, welches der γ -Untereinheit entspricht. Allerdings ist diese Masse nicht zentral, sondern interagiert nur mit einem α - β -Paar. Dies bedeutet, daß nur durch die Konformationsänderung bei der Bildung einer $\alpha\beta\gamma$ -Struktur im $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplex - der kleinsten hydrolytisch aktiven Einheit - das Protein überhaupt eine enzymatische Funktion erlangt, wobei allerdings nicht geklärt ist, ob ein fester $\alpha\beta\gamma$ -Verband vorliegt oder eine Bewegung des $\alpha\beta$ -Trimers relativ zu γ stattfindet (Mitchell, 1984).

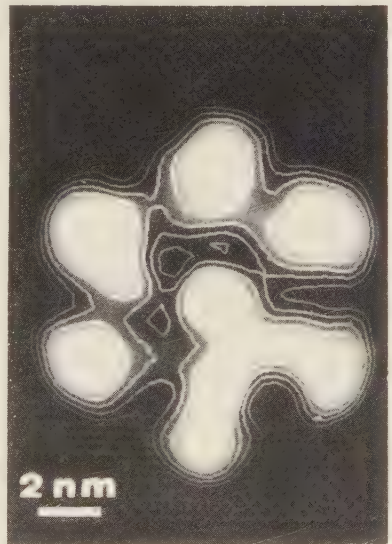


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Analyse der F_1 -ATPase (Boekema et al., 1986)

Auch hinsichtlich ihres chemischen Verhaltens lassen sich die β -Untereinheiten differenzieren. Es werden zwei katalytisch unterschiedliche Typen von β -Untereinheiten beobachtet (Lötscher und Capaldi, 1984; Stan-Lotter und Bragg, 1986; Lübbers et al., 1984; Wang, 1984), wobei jeweils zwei katalytisch inaktive und ein aktives α - β -Paar



präsent sind. Ob die strukturelle Asymmetrie die Ursache für die funktionelle Ungleichheit der β -Untereinheiten ist, bedarf noch weiterer Aufklärung.

Die γ -Untereinheit als Mittler zwischen dem katalytisch aktivem Zentrum und dem Element, welches das elektrochemische Potential nutzt, scheint daher eine wichtige Funktion bei der ATP-Synthese auszuüben.

Solange eine Kristallstrukturanalyse der F_1 -ATPase noch nicht vorhanden ist, können weitergehende Informationen über die Sekundärstruktur und dadurch möglicherweise über die Funktion der Untereinheiten durch einen Vergleich der Primärstrukturen erhalten werden, da bei einem phylogenetisch altem System strukturell essentielle Bereiche bereits aus der Primärstruktur zu erkennen sein sollten.

So ergab der Sequenzvergleich, daß der mitochondrialen δ -Untereinheit das bakterielle ϵ entspricht und die bakterielle δ -Untereinheit mit dem mitochondrialen OSCP (Oligomycin-Sensitivität übertragendes Protein) homolog ist. Für das mitochondriale ϵ ist im bakteriellen System kein vergleichbares Protein bekannt (Walker et al., 1985).

Bisher sind die Primärstrukturen von 4 verschiedenen γ -Untereinheiten bekannt; zwei aus photosynthetisch aktiven Bakterien (Falk et al., 1985; Tybulewicz et al., 1984), diejenige des E.coli-Enzyms (Walker et al., 1984) sowie die Sequenz des Rinderherz-Proteins (Walker et al., 1985). Obwohl insgesamt nur eine relativ geringe Sequenzidentität (18 %) vorliegt, lassen sich bereits hieraus erste Schlüsse ziehen. So zeigen die N- und C-terminalen Regionen gehäufte Identitäten, während im mittleren Bereich der Aminosäurenkette nur noch geringe Homologien auftreten - bis auf einen streng konservierten Bereich um das zentrale Cystein.

Da die drei großen Untereinheiten in allen F_1 -ATPasen nicht nur in Bezug auf ihre Größe, sondern auch hinsichtlich ihrer Primärstruktur konserviert sind, sollten sich auch ihre Sekundärstrukturen ähneln. Wenn es daher gelänge, den vorhandenen Sequenzdatensatz zu erweitern und dadurch eine fundierte Sekundärstrukturvorhersage zu ermöglichen, so würde sich dadurch eine Möglichkeit bieten, strukturell konservierte Elemente der γ -Untereinheit zu identifizieren und dadurch Informationen über ihren Aufbau zu erhalten. Da die γ -Untereinheit das Bindeglied zwischen dem katalytisch

aktiven $\alpha\beta$ -Hexamer und dem Membranteil ist, bindet sie auch mehrere Untereinheiten; zumindest die β - und die bakterielle ϵ -Untereinheit (Sone et al. , 1985). Eine Sekundärstrukturanalyse könnte daher auch dazu beitragen, diese Kontaktstellen zu identifizieren, insbesondere, da viele Untereinheitenkontakte über hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen (Schulz und Schirmer, 1978) , die bei der Sekundärstrukturvorhersage zu erkennen sind.

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Primärstruktur der γ -Untereinheit der mitochondrialen ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Zur Untersuchung der F_1 -ATPase wurde die Hefe gewählt, da dieser phylogenetisch alte, einzellige Organismus möglicherweise eine Mittelstellung zwischen den bakteriellen und den ATPasen höherer Organismen darstellt. Zudem war für die Hefe *S.cerevisiae* eine Präparationsmethode publiziert, welche die Isolierung verhältnismäßig reiner ATPase beschreibt (Takeshige et al. , 1976).

Da die F_1 -ATPase ein Enzymkomplex ist, ist die Grundvoraussetzung die Isolierung der einzelnen Untereinheiten, was bisher in diesem System nicht reproduzierbar möglich war. Dadurch wäre die Charakterisierung der individuellen Untereinheiten ermöglicht.

Die Sequenzermittlung wurde durch Edman-Abbau durchgeführt, um bei allen Untereinheiten die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmen zu können. Diese Proteinsequenz ist bei kernkodierten, in andere Organelle importierten und daher prozessierten Proteinen die einzige Möglichkeit, die Primärstruktur des aktiven Peptids und damit seine Größe exakt zu ermitteln.

Zudem sind bei Eukaryonten die kodierenden Loci wegen der Größe des Genoms und der Vielzahl der c-DNAs nicht so leicht zu erfassen, insbesondere, wenn das kodierende Genfragment über Deletionsmutanten gesucht werden muß. Wenn ein Protein isoliert und in ausreichender Menge vorhanden ist, so läßt es sich proteinchemisch bei Anwendung der HPLC ebenfalls mit akzeptablem Aufwand sequenzieren.

Ein weiterer Vorteil bei der Arbeit mit Proteinen liegt darin, daß die Eigenschaften des Peptids kennengelernt werden und das Protein "handhabbar" wird. Obwohl dies

trivial klingt, liegt darin eine Grundvoraussetzung z. B. für die Durchführung proteolytischer Spaltungen, chemischer Modifikationen oder bei Protein-komplexen für die Renaturierung des Enzyms aus den Untereinheiten. Das Bakteriorhodopsin, in dem nur wenige, besonders exponierte Stellen erreichbar sind, liefert einen Beweis für die Tatsache, daß das chemische Verhalten des Proteins erkannt sein muß, um damit erfolgreich arbeiten zu können (Gerber und Khorana, 1982).

Die vorliegende Arbeit ist also darauf hingerrichtet, eine präparative Trennung aller 5 Untereinheiten zu erreichen und ihre physikochemischen Eigenschaften zu untersuchen. Die reinen Untereinheiten können weitergehend durch eine mögliche Renaturierung des Gesamtkomplexes aus den reinen Peptiden zum Verständnis der F_1 -ATPase beitragen. Darüberhinaus ermöglicht die Reindarstellung auch die Primärstrukturermittlung der Untereinheiten, wobei insbesondere durch Sequenzvergleiche mit ATPasen anderer Organismen konservierte und daher strukturell und mechanistisch wichtige Bereiche erkannt werden können. Die hier durchgeführte Sequenzermittlung der γ -Untereinheit soll die Bedeutung dieser Untereinheit verstehen helfen. Dieses Peptid besitzt keine festen Bindungsstellen für Nukleotide oder andere Liganden der ATPase, trotzdem ist ohne dieses Peptid keine ATP-Hydrolyse möglich. Ihre Rolle als Mittler der Aktivität oder als Träger der katalytischen Bindungsstelle kann vielleicht durch einen Sequenzvergleich besser verstanden werden.

2. Materialien und Methoden

2. 1. Chemikalien

Phenylisothiocyanat (sequanal grade, Pierce, Rockfort) , Heptan und Methanol (Burdick & Jackson,) wurden ohne weitere Reinigung zur Sequenzanalyse eingesetzt. Ethylacetat (Burdick & Jackson) mußte gelegentlich nachgereinigt werden, da sich trotz Zusatz von 0,1 % Ethylmercaptan nach einiger Zeit Peroxide bildeten. Zur Reinigung wurde das Ethylacetat über Al_2O_3 filtriert und anschließend destilliert.

Trimethylamin (30 %ige wässrige Lösung, E.Merck, Darmstadt) wurde jeweils über Nacht mit Toluolsulfonylchlorid (20 g/l), 2x mit Ninhydrin (5 g/l) und mit DABITC (0,5 g/l) bei Raumtemperatur gerührt und anschließend nach Zusatz von KOH bei 50 ° C überkondensiert. Zum Sequenzieren wurde eine 25 % ige Lösung verwendet.

Pyridin (E.Merck, Darmstadt bzw. Fluka, Heidelberg, zur Sequenzanalyse) mußte zur Sequenzanalyse weiter aufgereinigt werden. Es wurde deshalb jeweils über KOH (5 g/l) , Ninhydrin (2 g/l) und DABITC (0,5 g/l) mehrere Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend fraktioniert.

Trifluoressigsäure (E.Merck, Darmstadt) wurde jeweils über CrO_3 , β -Alanin und P_2O_5 destilliert.

Das verwendete Wasser war deionisiert und anschließend zweifach quartzdestilliert. Acetonitril und Essigsäure entsprachen HPLC-Qualitäten (J.T.Baker, Groß-Gerau).

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren p.a.-Qualitäten verschiedener Hersteller. Die Proteasen wurden von den Firmen Worthington (Clostripain, Chymotrypsin), Pierce (S.aureus Protease) und Böhlinger, Mannheim (Trypsin, TPCK-behandelt, Thermolysin sowie Sojabohnen Trypsin-Inhibitor) bezogen.

2. 2. Instrumentation

Die Aminosäurezusammensetzung wurde mit einem Biotronik M 7000 Aminosäureanalysator bestimmt. Es wurden ausschließlich saure Hydrolysen durchgeführt (6 N HCl mit 0,1 % Phenol, 112 °C, je 24 h, 48 h und 72 h Hydrolyse).

Circular-Dichroismus-Messungen wurden mit einem Jobin-Yvon M III-Dichrographen ausgeführt. Die Rohdatenaufnahme erfolgte mit einem Transienten-Recorder (Modell 1074 , Nicolet, Madison) Sie wurden anschließend mit einem Perkin-Elmer OS/3 Großrechner ausgewertet.

Die HPLC-Anlagen sind Produkte der Firma Beckman Instruments. Sie bestehen aus je zwei M 112 Pumpen und einem M 420 Programmer. Die Proben für die PTH-Analysen wurden mit einem WISP-M2B (Waters GmbH, Eschborn) Probengeber aufgegeben, die Peptidlösungen manuell mit einem M 210 Probengeber.

Die F₁-Untereinheiten wurden mit einem M160 Festwellenlängen-Detektor bei 229 nm detektiert, die Spaltpeptide bei 214 nm.

Zur Peptidtrennung wurden μ -Bondapak C-18 Säulen (Waters, 300 $\times$ 3,9 mm) verwendet, zur PTH-Trennung kamen Ultrasphere ODS Säulen (Beckman, 250 $\times$ 4,6 mm) zur Anwendung.

Die manuelle Sequenzanalyse erfolgte mit einer Ausrüstung ähnlich der beschriebenen (Tarr, 1975), bestehend aus einer Vakuumapparatur mit einer RD-8 Drehschieberpumpe (Leybold-Heraeus, Köln) und einem Glaspumpenstand mit zwei Kühlfallen sowie zwei getrennt zu öffnenden Schliffansätzen für die zu trocknenden Proben. Zusätzlich wurden 3 Temperierblöcke mit Bohrungen zur Aufnahme der Reaktionsgefäße sowie der Reagenzlösungen benötigt. Alle Reagenzien wurden in Gläsern mit Teflon-Dichtungen (Mininert-Valves, Pierce) unter Argon bei 0 °C aufbewahrt.

2.3. Methoden

2.3.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Lämmli (Lämmli, 1970) durchgeführt.

Das Trenngel bestand aus einem linearen Gradienten von 10 % bis 17,5 % Acrylamid bei einem Quervernetzungsgrad von 2,7 % und das Konzentrierungsgel aus 4,5 % Acrylamid, 0,15 % Bisacrylamid, 0,06 % TEMED, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA, 125 mM Tris-HCl bei pH 6,8 zusammen. Der Trenngelpuffer bestand aus 0,375 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS und 0,05 % TEMED. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur mit Ammoniumperoxodisulfat. Das Gel bestand aus 30 ml Trenngel und 8 ml Konzentrierungsgel, zur Polymerisation wurden 120 μ l (Trenngel) bzw. 70 μ l (Konzentrierungsgel) einer 10 Gew.-% igen wässrigen Persulfatlösung verwendet. Die Trennstrecke betrug 10 cm, die Schichtdicke 2 mm.

Der Elektrophoresepuffer bestand aus 0,1 % SDS, 50 mM Tris, 385 mM Glycin und 2 mM EDTA. Die Proben wurden in 2 % SDS, 2 mM EDTA, 10 % Glycerin und 50 mM Tris-HCl bei pH 6,8 aufgenommen. Gelegentlich wurde 1 % 2-Mercaptoethanol zugesetzt. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur im Probenpuffer inkubiert. Die Elektrophorese wurde 4 h bei einer Stromstärke von 40 mA durchgeführt.

Fixiert und gefärbt wurde eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in 45,5 % igem wässrigen Methanol mit 9,2 % Essigsäure und 0,25 % Coomassie Blau R 250 (Serva, Heidelberg); entfärbt wurde in 5 %igem wässrigem Methanol mit 7,5 % Essigsäure.

2.3.2. Sequenzierung

Die manuelle Sequenzanalyse wurde im wesentlichen nach Tarr (1975, 1982) in Reagenzgläsern (6*70 mm) mit Eindrückstopfen aus Polyethylen durchgeführt .

Die Kupplung erfolgt mit je 20 µl PITC / Pyridin / Hexafluoroisopropanol (5:19:1) und Pyridin / 25 % Trimethylamin (1:1) bei 50 °C. Peptide wurden 5 min, die Untereinheiten 8 min umgesetzt; bei den Untereinheiten wurde der erste Kupplungsschritt wiederholt.

Die Extraktion von Reagenzien und Lösungsmittel erfolgte je 2 × mit Heptan / Essigester 10:1 und 4 × mit Heptan / Essigester 2:1, danach wurde im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet (<0.5 mbar). Die Abspaltung der PTC-Aminosäure erfolgte mit 20 µl rauchender HCl innerhalb von 2 min bei Raumtemperatur; nach dem Trocknen wurden die ATZ -Aminosäuren mit 20 µl Methanol 2 min bei 50 °C verestert.

Zur Extraktion wurde die Probe mit 5 µl Wasser und 40 µl Heptan / Essigester 1:2 geschüttelt, zentrifugiert, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Heptan / Essigester / Trimethylamin / Hexafluoroisopropanol, pH 7, erneut extrahiert.

Nach dem Trocknen der vereinten organischen Phasen wurden die ATZ-Aminosäuren mit 20 µl 1 M methanolischer HCl für 10 min bei 65 °C zu den PTH-Derivaten umgelagert. Nach jeder Reagenzzugabe wurde das Reagenzglas mit Argon gespült.

Die getrockneten PTH-Aminosäuren wurden in 50 µl Acetonitril aufgenommen und konnten danach identifiziert werden.

Die beschriebene Apparatur ermöglichte das gleichzeitige Sequenzieren von 9 Proben; routinemäßig sind 3 Schritte pro Tag möglich.

Die Identifizierung der PTH-Aminosäuren erfolgte in Anlehnung an das von Tarr (Tarr, 1981) beschriebene Verfahren durch HPLC, das es erlaubte, noch 5 pmol sicher nachzuweisen. Das Gradienten-System bestand aus 63 mM Essigsäure/ NH₃, pH 4,3 (Lösung A) und Acetonitril (Lösung B). Die folgenden Bedingungen wurden benutzt:

Flußrate	0,5 ml /min
0 - 5 min	80 % A, 20 % B
5 - 19 min	linearer Gradient von 20 % auf 48% B
27-28 min	von 48 % auf 80 % B ,
29-30 min	von 80 % auf 20 % B
29-30 min	von 0,5 auf 1,5 ml/min
43 min	von 1,5 auf 0,5 ml/min

Nach 45 min erfolgte die nächste Injektion.

Die Identifizierung der PTH-Aminosäuren erfolgt bei 269 nm mit einem M 165 Detektor. Simultan wurde bei 245 nm gemessen; der Quotient 245 nm/269 nm ermöglicht eine sichere Unterscheidung zwischen PTH-Lys und PTH-Phe. PTH-dehydro-Ser und PTH-dehydro-Thr wurden bei 320 nm nachgewiesen. Die Säulenthmostatisierung erfolgte mit einem wasserbeheizten Säulenofen, die Temperatur betrug 53,5 °C.

2.3.3. Circular-Dichroismus-Messungen

Zur Messung des Circular-Dichroismus wurden die Untereinheiten in 40 %igem, wässrigem Acetonitril, 10 mM TFA gelöst. Die Proteinkonzentrationen betrugen:

α : 0,117 mg /ml

β : 0,360 mg /ml

γ : 0,545 mg /ml

δ : 0,293 mg /ml

ϵ : 0,171 mg /ml

Die Schichtdicke betrug 0,1 mm, jedes Spektrum wurde 32 mal gemittelt bei einer Meßgeschwindigkeit von 3 nm / min.

Als Referenzspektren für den Vergleich mit den gemessenen CD-Spektren wurden die Daten von Compton und Johnson (1986) und Brahms und Brahms (1980) benutzt. Insgesamt standen so 18 Referenzspektren von Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur zur Verfügung.

2.3.4. Präparation der F₁-ATPase

Die Hefe (ATCC 24967) wurde über zwei Vorkulturen (je 5 × 50 ml und 1 l) in einem 150 l Fermenter (F150, New Brunswick Scientific Co, New Jersey) in 100 l Glucose-haltigem Medium gezüchtet.

Das Nährmedium bestand aus 100 g KH₂PO₄, 120 g (NH₄)₂SO₄, 70 g MgSO₄ × 7H₂O, 50 g NaCl, 40 g CaCl₂ × 2H₂O, 500 mg FeCl₃ × 6H₂O, 800 g Glucose und 250 g Hefeextrakt (Difco, Detroit).

Nach 20 h wurden die Hefezellen mit einem Separator (Westfalia, Sölde) auf rund 6 l aufkonzentriert und zweimal bei 3000 × g aus Wasser abzentrifugiert (Zentrifuge Fa. Stock, Marburg). In der Regel wurden so 1,2 kg Hefe (Feuchtgewicht) erhalten. Die weitere Aufarbeitung folgte exakt der für kommerzielle Hefe ausgearbeiteten Methode (Takeshige et al, 1976) mit der Ausnahme, daß wegen der geringeren Zellgröße die Umdrehungszahl der Zelmühle von 2500 U/min auf 3000 U/min erhöht wurde.

Im Durchschnitt resultierten hieraus F₁-Präparate von 18 mg mit spezifischen Aktivitäten von 200 Einheiten/mg im gekoppelten Test nach Pullman (Pullman et al, 1960).

2.3.5. Trennung der F₁-Untereinheiten

Zur Trennung wurden die F₁-Präparate mit Harnstoff gesättigt und zur Vermeidung einer N-terminalen Blockierung durch das in Harnstoff anwesende Cyanat (Stark et al., 1960) mit 1 Vol-% Trifluoressigsäure auf etwa pH 4,5 angesäuert. Nach Filtration durch 0,22 µm Filter (Millex GV; Millipore, Eschborn) konnten die Untereinheiten direkt durch die HPL- Chromatographie isoliert werden. Die Trennung erfolgte mit einem linearen Gradienten von 30 % auf 60 % Acetonitril mit 10 mM TFA in 10 mM

wässriger TFA innerhalb von 30 min bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die gereinigten Untereinheiten wurden nach der Trennung lyophilisiert.

Zur Rechromatographie wurden die Peptide in gesättigter Harnstofflösung mit 1 Vol-% TFA und 10 mM EDTA gelöst. ϵ wurde mit 35 % Acetonitril als Startbedingung, die anderen Untereinheiten mit 40 % Acetonitril aufgetrennt. Die Lösungsmittel, die Steilheit des Gradienten und die Flußrate waren die gleichen wie bei der Auftrennung von F_1 angewandt. In allen Fällen wurden 230 μ l injiziert.

2.3.6. Carboxymethylierung

Die Carboxymethylierung erfolgte in Anlehnung an Crestfield et al. (1963). Dazu wurde das Protein in 1,2 ml 8 M Harnstoff, 10 mM EDTA und 350 mM Tris-HCl bei pH 8.6 gelöst. Zur Reduktion wurden 10 μ l einer 2,09 % igen (v/v) wässrigen 2-Mercaptoethanol-Lösung zugesetzt (2,98 μ mol). Nach 3 h bei Raumtemperatur wurden 3 μ mol α -Jodessigsäure in 200 μ l Puffer zugefügt. Bei der Verwendung von α - 14 C-Jodessigsäure entsprach dies 25 μ Ci, die spezifische Aktivität betrug 8,33 mCi / mmol. Alle weiteren Schritte bis zur vollständigen Entfernung überschüssigen Jodids erfolgten unter Lichtabschluß. Nach 30 min wurde die Carboxymethylierung durch Zugabe von 50 μ l der Mercaptoethanol-Lösung abgebrochen, nach weiteren 30 min wurde die Reaktionsmischung 6 mal gegen 10 mM TFA in Wasser dialysiert.

2.3.7. Chemische Spaltungen

Die Spaltungen mit o-Jodosobenzoesäure wurden im wesentlichen nach Mahoney und Hermodson (1979) durchgeführt. Das Protein wurde in 4 M Guanidinium-HCl in 80 % iger Essigsäure gelöst und mit Jodosobenzoesäure sowie 15 Mol-% p-Kresol (bezogen auf Jodosobenzoesäure) im gleichen Lösungsmittel versetzt. Die Endkonzentration an Protein betrug 5 - 10 mg/ml, das Gewichtsverhältnis Protein zu

Jodosobenzoessäure 1:2. Die Spaltung wurde unter Lichtausschluß 20 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach Beendigung der Spaltung wurden die Proben über Sep-pak C₁₈-Kartuschen (Waters, Eschborn) entsalzt. Die Kartuschen wurden je zweimal mit 5 ml Methanol, 10 ml Wasser und 5 ml 10 mM wässriger TFA gewaschen. Der Spaltansatz wurde danach auf der Kartusche dreimal mit je 1 ml 10 mM TFA gewaschen und mit 10 mM TFA in 60 % igem wässrigen Acetonitril eluiert. Der Verlauf der Spaltung wurde durch Gelelektrophorese überprüft.

Das Protein wurde mit BrCN wie in der Literatur beschrieben (Schreiber und Witkop, 1964) in 70 % iger Ameisensäure bei Raumtemperatur gespalten. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml, das Verhältnis Protein zu BrCN war 1:20 (w/w). In Zeitintervallen (1 h, 2 h, 20 h, 44 h und 116 h) wurden Proben entnommen, lyophilisiert und mit der SDS-Gelelektrophorese analysiert.

2. 3. 8. Enzymatische Spaltungen

Alle Spaltungen wurden in 0,3 ml bzw. 1 ml Reacti-Vials (Pierce) durchgeführt. Bei allen Reaktionen wurde mechanisch gerührt. Die Proteine wurden jeweils in 8 M Harnstoff aufgenommen und mit dem entsprechenden Probenpuffer verdünnt auf eine Endkonzentration von 4 mg/ml. Die Harnstoffkonzentration war außer bei der Spaltung mit S.aureus Protease (0,5 M) immer 2 M. Das Verhältnis Peptid / Protease (Gew.-%) betrug 100:1, nach den angegebenen Zeiten wurde nochmals die gleiche Menge Protease zugesetzt. Alle Spaltungen erfolgten bei 37 °C.

Tabelle 1: Spaltbedingungen der Proteolysen der γ -Untereinheit

Protease	Menge	Puffer	2.Zugabe	Abstoppen	HPLC-Vorbereitung
Trypsin	1,5 mg	A	2h	4h, 1 % TFA	lyophilisiert, in 8 M Harnstoff gelöst
Clostripain	1,2 mg	B	4h	18h, -20 °C	fester Harnstoff
bis zur Sättigung					
Chymotrypsin	0,8 mg	C	1h	2h, 1% TFA + 200 μ l 8M Harnstoff	direkt nach dem Abstoppen
S. aureus	0,8 mg	D	4h	20 h, weiter wie Chymotrypsin	
Thermolysin	0,8 mg	E	1h	2 h, weiter wie Chymotrypsin	

Puffer A: 100 μ l 8 M Harnstoff, 300 μ l 200 mM NH_4HCO_3

Puffer B: 75 μ l 8 M Harnstoff, 225 μ l 200 mM Na-Phosphat, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM Ca-acetat, pH 7,6

Puffer C: 50 μ l 8 M Harnstoff, 150 μ l 200 mM Tris- HCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7,8

Puffer D: 20 μ l 8 M Harnstoff, 180 μ l 200 mM Na-Phosphat, pH 7,8

Puffer E: 50 μ l 8 M Harnstoff, 150 μ l 200 mM Na-Phosphat, 10 mM Ca-Acetat, pH 7,6

In allen Fällen wurde zuerst in Harnstoff gelöst, dabei entstand eine klare Lösung. Beim Verdünnen mit dem entsprechenden Puffer wurde eine Suspension der γ -Untereinheit erhalten. Die α -Untereinheit wurde, wie für γ beschrieben, mit Trypsin gespalten, es wurden allerdings 3 mg eingesetzt.

Die Proteasen wurden folgendermaßen behandelt: S. aureus-Protease und Thermolysin wurden als 0,1 % ige Lösung in Wasser, Chymotrypsin und Trypsin in der gleichen Konzentration in 1 mM HCl eingesetzt. Der Chymotrypsin-Lösung wurden 10 Gew.-% Soyabohnen-Trypsininhibitor zugesetzt. Clostripain wurde über Nacht bei 4 °C in 10 mM Ca-Acetat, 2,5 mM Dithioerythrit aktiviert.

2.3.9. Auftrennung der Spaltprodukte

Alle enzymatischen Spaltungen wurden an der oben beschriebenen HPLC-Anlage aufgetrennt. Jede Chromatographie wurde manuell fraktioniert, die zu sequenzierenden Proben anschließend direkt lyophilisiert. Pro Lauf wurden 200 μ l injiziert. Bei ^{14}C -markierten Proben wurden den Fraktionen Aliquots entnommen und auf ihren Radioaktivitätsgehalt untersucht.

Als Lösungsmittel bei der Trennung der γ -Spaltprodukte wurde 10 mM wässrige TFA (Laufmittel A) sowie 10 mM TFA in Acetonitril (B) verwendet. Die Flußrate betrug in allen Fällen 1 ml/min. Im einzelnen wurden folgende Bedingungen angewandt:

γ + Trypsin

0 % B auf 50 % B in 50 min

γ + Clostripain

0 % B auf 15 % B in 7,5 min

15% B auf 50 % B in 50 min

γ + Chymotrypsin

0 % B 2 min

0 % B auf 5 % B in 5 min

5 % B auf 20 % B in 30 min

20% B auf 35 % B in 45 min

35% B auf 60 % B in 15 min

γ + S.aureus Protease

0 % B 2 min

0 % B auf 5 % B in 5 min

5 % B auf 20 % B in 30 min

20% B auf 40 % B in 50 min

40% B auf 60 % B in 10 min

γ + Thermolysin

0 % B 5 min

0 % B auf 20 % B in 50 min

Nach jedem Lauf wurde 2 min bei 80 % B gespült und die Säule anschließend 20 min bei den Startbedingungen equilibriert.

Mischfraktionen wurden wenn nötig rechromatographiert. Dazu wurden die Fraktionen lyophilisiert, in je 400 μ l 8 M Harnstoff, 10 mM EDTA und 1 % TFA gelöst und mit einem Acetonitrilgradienten gegen 10 mM K-Phosphat, pH 6,0 bei 60 °C eluiert. Als Anfangsbedingung wurden 10 % weniger Acetonitril als bei der Elution benutzt und der Gradient mit der gleichen Steilheit entwickelt.

Die salzhaltigen Fraktionen wurden an Sep-Pak-Kartuschen (Waters, Eschborn) entsalzt. Dazu wurden die Kartuschen gewaschen und mit 10 mM TFA äquilibriert. Die Proben wurden direkt aufgegeben, mit 2 $\times$ 1 ml 10 mM TFA gewaschen und danach mit 2 $\times$ 1 ml 10 mM TFA, 40 % Acetonitril in Wasser eluiert.

3. Resultate

3. 1. Reinheitskontrolle der ATPase

Bei der Verwendung kommerzieller Bäckerhefe (Fa. Moormann, Werne) konnten die Untereinheiten nie einheitlich isoliert werden, da schon die präparierte F_1 -ATPase durch fremde Polypeptide verunreinigt waren. Charakteristisch waren Proteine mit Molekulargewichten von 63 kDa bzw. 42 kDa, die z. T. in erheblichen Umfang auftraten, sowie ein Polypeptid ($M = 51$ kDa), dessen chemische Eigenschaften denen der α -Untereinheit so stark glichen, daß die Abtrennung nicht gelang. Daneben traten in untergeordnetem Maße Peptide im Molekulargewichtsbereich von 20 - 30 kDa auf. Der Ursprung all dieser Nebenprodukte ist nicht bekannt, für die kleineren wurde diskutiert (Somlo et al. , 1982), daß es sich um Untereinheiten des F_0 -Teils handelt. Vermutlich kommen auch noch andere mitochondriale Proteine oder Abbauprodukte der F_1 -Untereinheiten (z. B. das 51 kD-Protein) als Verunreinigungen in Betracht.

Die proteinchemische Charakterisierung der Untereinheiten aus kommerzieller Hefe wird noch zusätzlich erschwert durch ihre Mikroheterogenität. Abbildung 2 zeigt das HPLC-Chromatogramm der F_1 -ATPase, wobei die Bedingungen so gewählt wurden, daß eine besonders gute Auftrennung der mit der ϵ -Untereinheit korrelierenden Peptide erreicht wurde: 4 stabile Polypeptide, die sich in der SDS-Gelelektrophorese identisch verhalten, können isoliert werden. Eine Rechromatographie der einzelnen Fraktionen zeigt, daß es sich um stabile Produkte handelt, d. h. ein Konformerengemisch läßt sich ausschließen.

Alle Untereinheiten sind in der SDS-Gelelektrophorese einheitlich. Allerdings zeigt die isoelektrischen Fokussierung der Untereinheiten ein komplexes Bandenmuster für jede Untereinheit, indikativ für eine unterschiedliche Primärstruktur oder eine chemische Modifikation der Proteine. Dieses Muster erscheint auch bei der

Fokussierung von reinem F_1 , zudem sind einige der Banden zu höherem pH verschoben, so daß eine Modifikation der Aminogruppen durch das Cyanat aus dem Harnstoff ausgeschlossen werden kann. Die ϵ -Untereinheit kann wegen ihres hohen pIs nicht befriedigend fokussiert werden, doch zeigt ja gerade hier die HPLC die Heterogenität des Peptids.

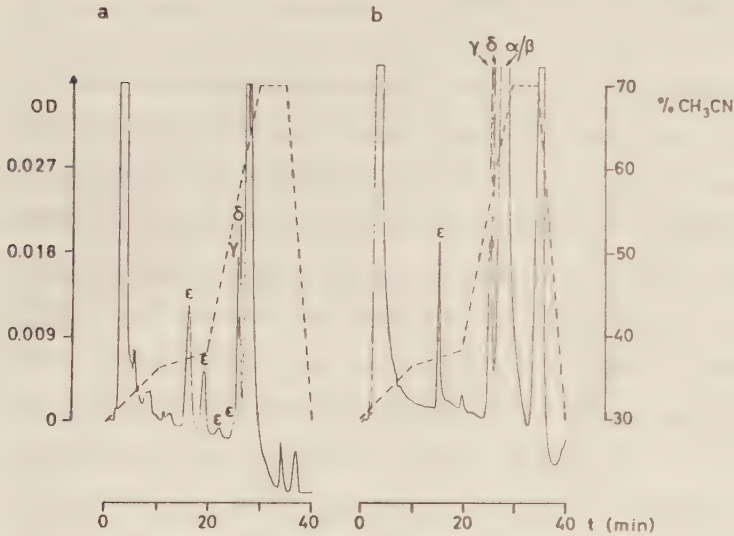


Abb. 2 : Trennung der ϵ -Untereinheit der F_1 -ATPase. In a wurde ein kommerzielles Präparat analysiert, b entspricht der Trennung einer Reinstamm-ATPase. Als Laufmittel wurde 0,05 %ige TFA in Wasser sowie Acetonitril als organische Phase benutzt. Die Flußrate war 1 ml/min.

Diese Beobachtungen lassen sich entweder dadurch erklären, daß kommerzielle Bäckerhefe aus mehreren Hefestämmen besteht oder daß äußere Faktoren diese Verunreinigungen hervorrufen.

Wird statt Bäckerhefe Reinstammhefe unter kontrollierten Bedingungen verwendet (in diesem Fall *S. cerevisiae* ATCC 24967), so wird ein Großteil dieser Probleme vermieden. Zum einen treten die Fremdpeptide nur in untergeordnetem Maße auf (<5 Mol-%), zum anderen zeigt sich Mikroheterogenität nur noch bei α , γ und ϵ . Auf diese Heterogenität wird weiter unten noch eingegangen.

3.2. Trennung der Untereinheiten

Die isolierten Untereinheiten der F_1 -ATPase, insbesondere α und γ , sind in neutralen Medien schwer löslich. Ursache für dieses Verhalten ist die Assoziation der Untereinheiten. Um Lösungen zu erhalten, müssen Harnstoff oder Guanidinium-Salze zugesetzt werden. Es bilden sich selbst in 8 M Harnstoff Aggregate mit Molekulargewichten von über 10^6 Da, wie dynamische Lichtstreuemessungen zeigten (Begusch, 1980). Erst in 4 M Guanidinium-thiocyanat bilden sich Monomere. Diese Assoziation der Untereinheiten setzt kurz nach der Dissoziation der F_1 -ATPase ein (N. Uwira, persönliche Mitteilung). Für die Trennung der Untereinheiten wirkt sich diese Aggregatbildung erschwerend aus. Zum einen ist man auf die Anwesenheit von Harnstoff angewiesen, um überhaupt die ATPase-Untereinheiten zu lösen. Zum anderen stellt ein Gemisch verschieden großer Komplexe auch immer ein Gemisch verschiedener Substanzen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften dar.

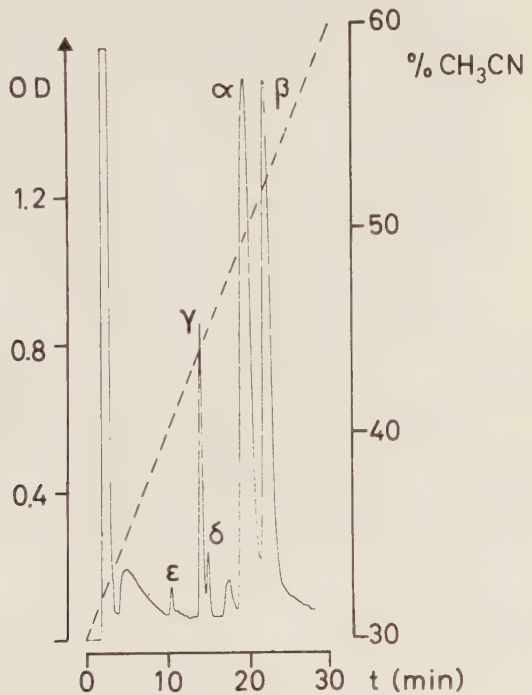
Die Assoziation von Proteinen wird im Wesentlichen durch folgende Faktoren verstärkt:

a) durch ionische und b) durch hydrophobe Wechselwirkungen. Beide Arten von Wechselwirkungen werden durch die bei der HPLC häufig verwendeten Lösungsmittel - wässriges Acetonitril bei niedrigem pH - reduziert. In solchen Lösungsmitteln -hier 10 mM TFA in 50 % igem Acetonitril- ist selbst die lyophilisierte α -Untereinheit bis zu Konzentrationen von rd. 0,5 mg/ml gut löslich, wobei dynamische Lichtstreuexperimente darauf hindeuten, daß solche Lösungen sehr kleine Moleküle, wahrscheinlich

Monomere, enthalten. Da die Untereinheiten auch bei sehr hohen Acetonitrilkonzentrationen löslich sind, bot sich eine Trennung über reversed-phase-HPLC an.

Abbildung 3 zeigt das Chromatogramm einer HPLC-Trennung der Untereinheiten. Alle Untereinheiten können in einem Schritt mit hoher Reinheit erhalten werden. Für ϵ , γ und α ist im allgemeinen keine weitere Nachreinigung notwendig. Lediglich δ (rd. 15 mol-% γ) und β (10 mol-% α) sollten für höhere Ansprüche, wie sie z. B. bei Rekonstitutionsexperimenten gestellt werden, rechromatographiert werden. Die Reinheit der Fraktionen ist in Abbildung 4 dargestellt.

Abb.3: HPLC-Chromatogramm einer F_1 -ATPase-Trennung. Die Fraktion zwischen δ und α entspricht der Mischfraktion. Die Trennbedingungen sind wie auf S. 12 angegeben. Es wurden 2,3 mg F_1 -ATPase eingesetzt.



Auffallend ist das Verhalten der ϵ -Untereinheit. Der weitaus größte Teil findet sich in der ersten Fraktion, ca. 8% dieser Menge in der 2. Fraktion (s. Abbildung 2, Seite 19). In der γ - und δ -Fraktion findet sich kein ϵ , dafür aber eine größere Menge in der Mischfraktion. In seltenen Fällen spaltet sich diese Mischfraktion in zwei Peaks auf, wobei γ nur in dem zweiten Bereich gefunden wird. Dies legt nahe, daß die Mischfraktion aus einem $\gamma\delta\epsilon$ - und einem $\delta\epsilon$ -Komplex besteht.

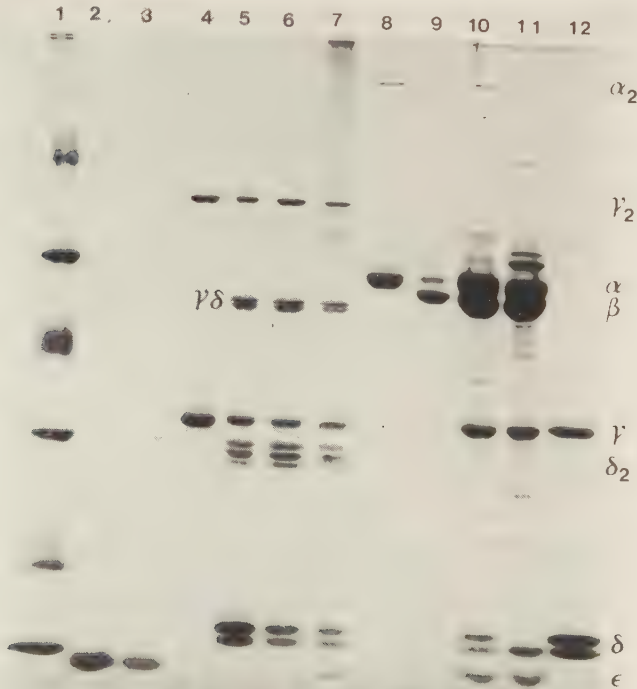


Abb. 4: Gel-Elektrophorese der F_1 -Trennung.

Die Reihen 2-9 entsprechen den Fraktionen der HPLC-Trennung. Die Reihe 3 entspricht der 2. ϵ -Fraktion (s. S. 19), die Reihen 5 und 6 dem Anfang und Ende der δ -Fraktion. Die Reihe 12 entspricht 5, außer daß 1 % 2-Mercaptoethanol zugesetzt wurden. Die Reihen 10 und 11 entsprechen ATPase-Präparationen einer Reinstamm-Hefe und einer kommerziellen Hefe. In Reihe 1 ist ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen.

Abbildung 5 zeigt ein SDS-Gel der rechromatographierten Untereinheiten unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Proben wurden direkt nach der Trennung lyophilisiert und getrennt. Dadurch ist der äußerst geringe Anteil an Dimeren bedingt. Die Trennung wurde mit einer sehr großen Menge Protein durchgeführt (20 μ g Protein je Fraktion), die β -Untereinheit enthält danach keinerlei α -Anteil und auch in der δ -Untereinheit sind nur geringe Spuren der γ -Untereinheit zu finden.



Abb. 5: SDS-Gel der gereinigten Untereinheiten. Die Reihen 1 und 6 entsprechen Molekulargewichtsmarken (94, 67, 43, 30, 20,1 und 14,4 kDa) , die Reihen 2-5 zeigen die Untereinheiten.

Um eine optimale Trennung zu erzielen, müssen einige Bedingungen eingehalten werden.

1) Die F_1 -ATPase muß dissoziiert sein. Dazu wird das Präparat mit Harnstoff gesättigt und zur Verhinderung einer Carbamylierung mit 1 Vol-% TFA versetzt. Dabei muß eine Adduktbildung nach der Dissoziation der Untereinheiten in Kauf genommen werden, da nur die Untereinheiten als solche in Acetonitril löslich sind. Offenbar erfolgt gleichzeitig eine weitgehende Monomerisierung der Untereinheiten-Assoziate. Intaktes F_1 präzipitiert beim Kontakt mit dem Laufmittel sofort, anscheinend ohne dabei zu dissoziieren.

2) Entscheidend für die Trennleistung sind die Steilheit des Acetonitrilgradientens sowie die Flußrate mit einem Optimum bei 1 % Acetonitrilzunahme / min und einer Flußrate von 1 ml /min. Ein steilerer Gradient (höhere Flußrate) bringt die β -Untereinheit näher zu α , ein flacherer Gradient (geringere Flußrate) reduziert die Ausbeuten erheblich.

Unter optimalen Bedingungen liegen die Ausbeuten bei rd. 60 - 70 % (s. Tabelle 2). Nimmt man ein gleichmäßiges Adsorptionsverhalten der einzelnen Untereinheiten an, lassen sich die Proteinausbeuten mit einer Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ erklären. Insbesondere das Verhältnis von α oder β zu γ ergibt recht gut ein Verhältnis von 3:1. Ob die beiden kleinen Untereinheiten jeweils nur eine Kopie zum Enzymkomplex beisteuern, kann aus diesen Daten nicht einwandfrei geklärt werden.

Tabelle 2: Ausbeuten der F_1 -Untereinheiten bei der HPLC-Trennung von 10,2 mg F_1 -ATPase.

	α	β	γ	δ	ϵ
Protein (mg)	2,59	2,88	0,40	0,16	0,08
Peptid (nmol)	44,6	55,3	12,6	15,9	10,9
Peptid (nmol, korrt)	50,1	49,8	14,1	8,5	8,7

Bei der Korrektur wurden die 10 mol% α in der β -Fraktion bzw. die 15 mol% γ in der δ -Fraktion berücksichtigt. Der Gehalt von γ , δ und ϵ in der Mischfraktion wurde nicht berücksichtigt; er ist für die geringe Ausbeute bei den kleinen Untereinheiten verantwortlich. Die Gesamtausbeute entspricht 60 %, es wurden 6,1 mg Protein wiedergewonnen.

Ausbeuten von 60 -70 % bedeuten, daß Protein auf der HPLC-Säule abgelagert wird, so daß normalerweise eine Säule etwa 200 mal benutzt werden kann. Da pro Lauf ca. 1,5 mg F_1 aufgegeben werden, können etwa 300 mg Protein mit einer HPLC-Säule getrennt werden .

3.3. Charakterisierung der Untereinheiten

3.3.1. Molekulargewicht

3.3.1.1. Molekulargewichtsbestimmung aus dem SDS-Gel

Die Molekulargewichte der Untereinheiten wurden nach ihrer Position im SDS-Gel relativ zu Marker-Proteinen bestimmt, wobei ein Acrylamidgradientengel verwendet wurde.

Die erhaltenen Werte entsprechen im Wesentlichen den Literaturdaten (Knowles und Penefsky, 1972, Stutterheim et al. , 1981) und sind typisch für mitochondriale F_1 -ATPasen mit einem δ um 14 kDa . Für die ϵ -Untereinheit wurden bei mitochondrialen ATPasen kleinere Werte bestimmt, im Rinderherz-Enzym z. B. aus der Proteinsequenz nur 5,6 kDa (Walker et al. , 1985) , beim Hefe-Enzym nach Gelelektrophorese nur 6,5 kDa (Stutterheim et al. , 1981). Erwähnt werden soll noch, daß in SDS-Gelen ohne Acrylamidgradienten die kleinen Untereinheiten ein wesentlich geringeres apparentes Molekulargewicht aufweisen, nämlich nur 10 kDa (δ) und 8 kDa (ϵ).

3.3.1.2. Exakte Molekulargewichte der α -, β - und γ -Untereinheiten

Die Kenntnis der N-terminalen Sequenzen (s. Seite 32) wie der c-DNA-Sequenzen der α - und β -Untereinheit der Hefe- F_1 -ATPase (Takeda et al., 1986; Takeda et al., 1985) ermöglicht es, das exakte Molekulargewicht der reifen Untereinheiten zu bestimmen. Das Gleiche gilt für die γ -Untereinheit, deren Proteinsequenz ermittelt wurde (s.unten). Diese exakten Molekulargewichte sind in relativ guter Übereinstimmung mit den Daten aus der SDS-Gelelektrophorese.

Tabelle 3 : Molekulargewichte der F_1 -Untereinheiten

	Sequenz	Aminosäuren	Gradienten-	Lineares SDS-Gel
α	54585,8	505	58000	58000
β	51296,3	478	52000	52000
γ	31747,6	287	32000	32000
δ	-	-	14000, 14500	10000, 10200
ϵ	-	-	10000	8000

3.3.2. Aminosäurebestimmung

3.3.2.1. Bestimmung des Tryptophan-Gehalts

Der Tryptophan-Gehalt der ATPase-Untereinheiten wurde durch zwei Verfahren ermittelt: zum einen photometrisch nach Edelhoch (E.Fassold, unveröffentlichte Ergebnisse), wobei der Tyrosin-Anteil am Gesamtspektrum nach Bildung des Tyrosinats abgezogen werden kann, zum anderen über die Spaltprodukte bei der Spaltung mit o-Iodosobenzoesäure. Da diese Spaltung ebenso wie die im Folgenden beschriebene BrCN-Spaltung nicht vollständig verläuft, sind bei der Analyse immer auch Partialbruchstücke zu erwarten. Der Verlauf der Spaltung und die Größe der Spaltpeptide wurde durch SDS-Elektrophorese überprüft.

Nach der Spaltung zeigten die δ -Untereinheit sowie, in Übereinstimmung mit der DNA-Sequenz, die β -Untereinheit keinerlei Veränderungen im SDS-Gel, diese Untereinheiten enthalten also im Rahmen der Nachweisgrenze kein Tryptophan.

Die ϵ -Untereinheit war nach der Spaltung nur geringfügig kleiner. Wie die N-terminale Sequenzanalyse (s. Seite 32) zeigt, befindet sich das einzige Tryptophan dieses Peptids an Position 3 des N-Terminus, das Spaltpeptid weist daher eine Molekulargewichtsdifferenz von 362 Da auf, die nur unwesentlich über der Nachweisgrenze bei der SDS-Gelelektrophorese liegt.

Die γ -Untereinheit wird in zwei Peptide von 23 kDa und 9 kDa gespalten. Dies bedeutet, daß diese Untereinheit ein Tryptophan enthält.

Das Spaltmuster der α -Untereinheit ist komplexer. Es entstehen neben einer Reihe von Partialspaltprodukten als Endprodukte 4 Peptide mit den Molekulargewichten 6 kDa, 7 kDa, 21 kDa und 23 kDa. Die Größe der Spaltprodukte und die Anzahl der Tryptophane, nämlich 3, wird durch die DNA-Sequenz des Precursors bestätigt.

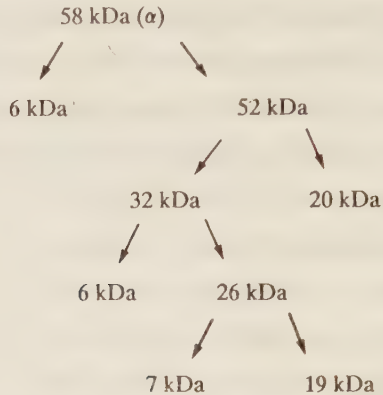
3.3.2.2. Bestimmung des Methionin-Gehalts

Ebenso wie der Tryptophan-Gehalt kann der Methionin-Gehalt eines Protein durch Analyse der BrCN-Fragmente bestimmt werden.

Die ϵ -Untereinheit enthält nach dieser Analyse kein Methionin. Die δ -Untereinheit wird in zwei gleich große Peptide gespalten, sie enthält also ein Methionin in der Mitte der Aminosäurekette. Für die β - und γ -Untereinheit war diese Analyse nicht möglich; sie enthalten so viele Methionine, daß keine Auswertung der SDS-Gele möglich war.

Die Analyse der BrCN-Spaltung der α -Untereinheit ergab zwei verschiedene Populationen von Endspaltprodukten. Zum einen wurden Peptide mit Molekulargewichten von 6-7 kDa, zum anderen solche mit 20 kDa gefunden. In beiden Bereichen, insbesondere im Bereich von 6-7 kDa, befinden sich mehrere Peptide, wie sich aus der Intensität der Coomassie-blue-Färbung ergibt. Daneben werden Partialspaltpeptide mit

Molekulargewichten von 52 kDa, 32 kDa und 26 kDa gefunden. Dieses Ergebnis läßt sich mit folgendem Spaltmuster erklären:



Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, daß die α -Untereinheit 4 Methionine enthält. Auch dieses Resultat bestätigt die DNA-Sequenz der α -Untereinheit.

3, 3, 2, 3, Aminosäureanalyse

Alle Aminosäureanalysen sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden; dabei sind die Ser- und Thr-Werte auf $t=0$ und die Val- und Leu-Werte auf $t=\infty$ extrapoliert. Zu beachten ist außerdem, daß der Gehalt an Tyr, Thr und Ser zu niedrig und der Glx-Gehalt zu hoch analysiert wird. Da diese Fehlbestimmungen nicht systematischer Art sind und daher von Probe zu Probe variieren, konnten dafür keine Korrekturen eingeführt werden. Die Werte für Met, Cys und Trp wurden durch andere Verfahren überprüft (siehe oben).

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der F₁-Untereinheiten

	α		β		γ		δ	ϵ
MW	54586		51296		31747		14000	10000
	a	b	a	b	a	b		
Ala	55,7	51	48,3	45	33,8	30	14,1	14,3
Arg	32,6	29	25,7	23	11,8	12	2,2	4,6
Asx	39,5	37	35,3	36	39,2	31	10,0	6,9
Cys ^{a)b)}	1	1	0	0	1	1	1	0
Glx	64,2	62	56,3	57	32,6	28	22,3	9,2
Gly	47,8	46	44,6	46	15,8	13	8,8	5,0
His	5,9	6	6,9	8	3,0	2	2,0	2,4
Ile	26,5	28	32,0	34	25,6	29	4,9	4,8
Leu	60,8	58	43,8	44	24,7	22	15,4	6,4
Lys	27,4	27	27,2	25	24,9	27	7,0	7,4
Met ^{a)c)}	3	4	5,7	6	8,0	10	1,0	0
Phe	15,4	15	16,7	16	8,8	10	6,0	1,6
Pro	15,2	19	18,3	23	10,4	10	5,6	3,5
Ser	37,6	41	24,8	30	18,7	22	7,8	7,8
Thr	21,4	21	32,1	28	24,9	19	10,9	8,5
Trp ^{d)e)}	3	3	0	0	1	1	0	1
Tyr	6,2	15	8,9	12	6,5	7	1,0	4,6
Val	46,6	42	45,5	44	12,7	13	12,5	3,1

Alle Werte in Mol / Mol. Die Spalten a und b bei α , β und γ entsprechen (a) den Analysenwerten und (b) dem tatsächlichen Aminosäuregehalt, bestimmt aus der DNA- (α , β) und der Protein-Sequenz(γ).

a) Bestimmt nach Peramcisensäure-Oxidation (E.Fassold)

b) Werte nach NEM-Alkylierung (Gregory und Hess,1981)

c) Bestimmt nach BrCN-Spaltung

d) Bestimmt nach IBA-Spaltung

e) Spektrophotometrisch nach Edelhoch, 1967 (E.Fassold)

Die Aminosäurezusammensetzungen der F₁-Untereinheiten zeigen einige Auffälligkeiten: Charakteristisch ist die Verteilung der Cysteine (Gregory und Hess, 1981). Die α -, γ - und δ -Untereinheiten enthalten lediglich je ein Cys, das nativ als freies Thiol vorliegt. Dies zeigt auch das SDS-Gel in Abbildung 4 (S. 22), in dem die Untereinheiten unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt sind: neben den Monomeren sind in geringem Maße Dimere nur von α , γ und δ sowie ein Heterodimer von δ und γ zu erkennen, die β - und ϵ -Untereinheiten können keine Disulfide bilden. Deutlich unterrepräsentiert sind daneben noch Trp und Tyr, nur die ϵ -Untereinheit enthält den üblichen Anteil an aromatischen Aminosäuren.

In den einzelnen Untereinheiten fallen daneben noch die hohen Anteile von Ala in ϵ , Glx und Leu in δ sowie Met in γ auf.

Interessant ist ebenfalls die Verteilung der basischen Aminosäuren (s. Seite 32). Diese Verteilung entspricht in der angegebenen Reihenfolge der Basizität der Untereinheiten, wobei die beiden kleinsten Peptide die extremsten pIs aufweisen.

3.3.3. Isolelektrische Fokussierung

Auf Grund des bereits beschriebenen Löslichkeitsverhaltens ist eine isoelektrische Fokussierung nur in Harnstoff möglich. Dies bedingt zweierlei:

1. alle angegebenen pI-Werte sind um rd. 0,5-0,7 pH -Einheiten zu hoch
2. da sowohl die Peptide als auch F₁ in Harnstoff aufgenommen werden, ist eine Carbamylierung besonders exponierter Aminogruppen möglich. Das bedeutet, daß es sich bei Nebenbanden mit kleinerem pI um modifizierte Peptide handeln kann.

ϵ kann wegen seines hohen pIs (deutlich über pH 10) nicht in einem gemeinsamen Gel dargestellt werden. Die β - und γ -Untereinheiten sind in der isoelektrischen Fokussierung einheitlich; nur in stark überladenen Gelen sieht man Nebenbanden; sie sind alle zum Säuren verschoben. Die δ -Untereinheit zeigt auch in der Fokussierung zwei Banden. Dies ist nach den Ergebnissen der SDS-Elektrophorese zu erwarten, bei

der die δ -Untereinheit ja auch als Doppelbande mit einem Molekulargewichtsunterschied von 450 Da erscheint.

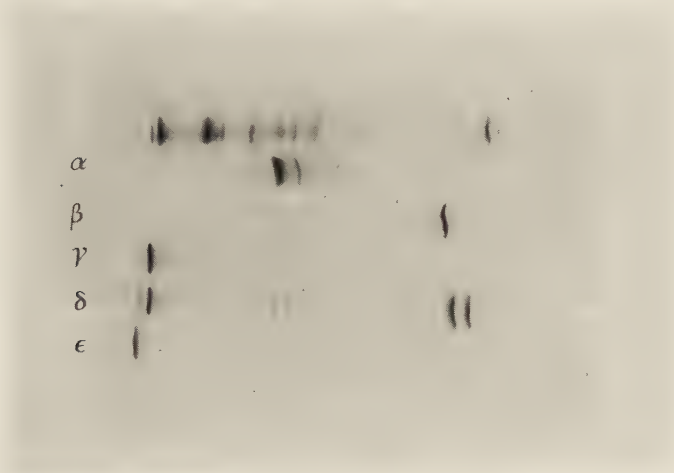


Abb. 6: Isoelektrische Fokussierung der F_1 -Untereinheiten

Dargestellt ist die isoelektrische Fokussierung der HPLC-Fractionen. Das Gel wurde aufgenommen mit einem Phastsystem-Fertiggel (Pharmacia) mit einem pH-Gradienten von 3-10. Da die F_1 -Untereinheiten in wässrigem Puffer unlöslich sind, wurde das Gel 2 min mit 2 ml 8 M Harnstoff-Lösung behandelt. Es wurde bei 10 °C 65 mWh vorfokussiert, die Fokussierung wurde bei einer Endspannung von 2000 V 500 mWh durchgeführt.

Die α -Untereinheit, nach der SDS-Elektrophorese vollkommen einheitlich, spaltet sich bei der hochauflösenden Elektrofokussierung in vier Banden auf. Nach der N-terminalen Sequenzanalyse sind 5 verschiedenen α -Untereinheiten zu erwarten, woraus folgt, daß zwei Peptide isoelektrisch sind.

Da die benutzten Trennbedingungen keine exakten Konzentrationsangaben in Bezug auf Harnstoff zulassen, kann an dieser Stelle keine Angabe über die exakten isoelektrischen Punkte der Untereinheiten gegeben werden. In 7 M Harnstoff wurden folgende Werte ermittelt:

Tabelle 5: isoelektrische Punkte und Verteilung der basischen Aminosäuren.

isoelektrische Punkte	Mol-% basische Aminosäuren
ϵ : > 10	15,8
γ : $8,6 \pm 0,1$	13,1
α : $7,7 \pm 0,3$	12,9
β : $5,5 \pm 0,2$	12,6
δ : $4,6 \pm 0,2$	8,5

Die angegebenen Werte für α und δ beziehen sich auf den Schwerpunkt zwischen den einzelnen Banden.

3.3.4. N-terminale Sequenz der Untereinheiten

Die N-terminalen Sequenzen der Untereinheiten lauten:

ϵ : S A W R K A A I S Y A

δ : A E A A A A

γ : A T L K E V E M X L K S I K

β : A S A A Q S T P I T

Während die oben angegebenen Sequenzen eindeutig ermittelt werden konnten, war dies bei der α -Untereinheit nicht möglich. Hier wurde im ersten Sequenzschritt immer E, A, G und S gefunden. E, A und G traten immer in einem konstanten Verhältnis von etwa 3:1:1, so daß von einer heterogenen Fraktion ausgegangen werden muß. Eine direkte N-terminale Sequenzanalyse der α -Untereinheit ist daher nicht möglich. Vergleicht man allerdings die kürzlich publizierte DNA-Sequenz (Takeda et al. , 1986) mit den Proteinsequenzdaten (s. oben) , so lassen sich 5 verschiedene N-Termini erkennen.

Tabelle 6; Zuordnung der N-terminalen Sequenzen der α -Untereinheit zur DNA-Sequenz

	34	40	50
1:	RLASTKAQPTEVSSILEERIKGVSD		
2:		AQPTEV-	
3:		EVSSIL-	
4:		SILEER-	
5:		EERIKG-	
6:		GVSD	

In Zeile 1 ist ein Ausschnitt aus der DNA-Sequenz der α -Untereinheit dargestellt, die Zeilen 2 -6 zeigen die proteinchemisch ermittelten N-Termini und ihre Position innerhalb der Primärstruktur.

Offensichtlich erfolgt während der Reifung der α -Untereinheit eine Proteolyse der N-terminalen Region, wie sie auch bei der β -Untereinheit des Rinderherz-Enzyms gefunden wurde (Walker et al. , 1985). Auf welcher Stufe, ob bei den Prozessierungsschritten zur reifen ATPase oder bei der Aufarbeitung, diese Proteolyse stattfindet, ist allerdings unklar. Im Gegensatz zur Rinderherz-ATPase liegen alle Peptide frei vor, die Bildung N-terminaler Pyrrolidoncarbonsäure erfolgt beim Hefe-Enzym nicht.

3.3.5. Circular dichroismus

CD-Spektren von Proteinlösungen im Bereich der $n \rightarrow \pi^*$ bzw. $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge enthalten theoretisch alle Informationen über die geometrische Anordnung der Peptidbindungen. Sie sind als Summe der Spektren aller einzelnen Strukturelemente zu betrachten, wobei neben den Strukturklassen auch die Kettenlänge der einzelnen Strukturelemente eine wichtige Rolle spielt. So ist z. B. die Form eines CD-Spektrums eines β -Strangs aus drei Aminosäuren deutlich anders als das einer β -Struktur aus 5 Aminosäuren. Lediglich das Spektrum einer α -Helix ändert mit der Kettenlänge nur seine

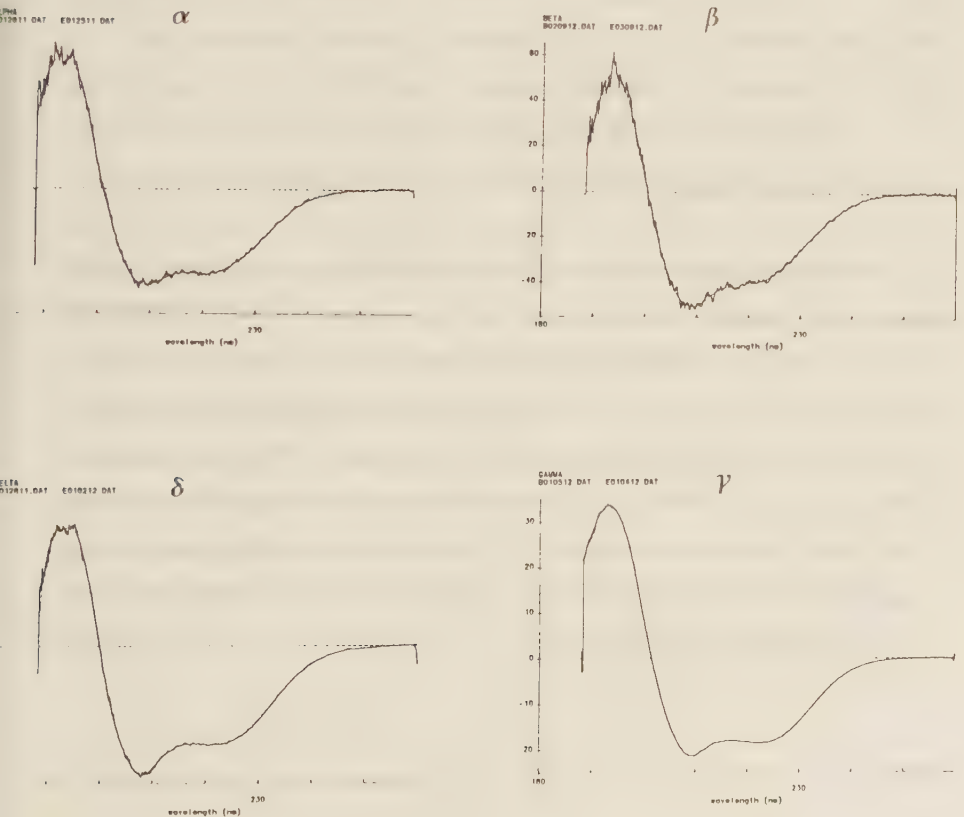
Intensität, nicht seine Form, so daß in diesem Fall ein Spektrum mit einer mittleren Kettenlänge exakt beschrieben ist (Chen et al., 1974).

Bei den meisten Berechnungen wird jedes CD-Spektrum als Linearkombination einer Reihe von Basisspektren betrachtet (Saxena und Wetlaufer, 1971; Compton und Johnson, 1986; Hennessey und Johnson, 1981; Chang et al., 1978). Sofern die Analyse auf den Vakuum-UV-Bereich ausgedehnt werden kann, liefern sie mit Referenzproteinen relativ gute Ergebnisse (Compton und Johnson, 1986; Manavalan und Johnson, 1985; Brahms und Brahms, 1980). Da die Spektren aus apparativen Gründen hier nur bis 188 nm aufgenommen werden konnten, ist eine Matrizen-Analyse mit sehr großen Fehlern behaftet. Die für die meisten Strukturelemente signifikanten CD-Signale haben ihre größten Amplituden im Vakuum-UV-Bereich, eine Linearkombination von kleinen Werten, die von einem dominanten Wert beherrscht werden (α -Helix), kann nur fehlerhafte Ergebnisse bringen.

Die Analyse wurde deshalb durch Vergleich der gemessenen Spektren mit Referenzspektren durchgeführt. Abbildung 7 zeigt die CD-Spektren der Untereinheiten. Auffallend ist, daß die Spektren der α - und der γ -Untereinheit praktisch identisch sind und daß auch die β - und die δ -Untereinheit sehr ähnliche Amplituden zeigen, im Gegensatz zur ϵ -Untereinheit, deren CD-Spektrum sich völlig von den anderen unterscheidet. Das Spektrum der ϵ -Untereinheit zeigt nicht das typische Doppelminimum der α -Helix, sondern ein einzelnes Minimum bei 218 nm. Auch der Null-Durchgang bei 206 nm sowie die geringen Ellipsitäten bedeuten, daß die ϵ -Untereinheit kaum helikale Anteile hat, sondern überwiegend aus β -Strukturen und unbestimmbaren Strukturanteilen aufgebaut ist. Die vier großen Untereinheiten, die offenbar einen sehr ähnlichen Gehalt an Sekundärstrukturelementen haben, zeigen das typische Spektrum eines Proteins mit einem hohem Helix-Gehalt, geringem β -Anteil sowie einem vergleichsweise hohen Anteil an unbestimmbaren Strukturbereichen. Das Maximum bei 193 nm, der Null-Durchgang bei 201 nm und das für die α -Helix charakteristische Doppelminimum bei 208 und 223 nm zeigen dies.

Die Spektren zeigen die gleiche Charakteristik wie das Spektrum von Lysozym, sie unterscheiden sich jedoch im β -Gehalt. Bei α und γ ist der Gehalt an β -Struktur ähnlich dem des Lysozyms (rd.15 %), bei der β - und insbesondere der δ -Untereinheit wird der β -Strukturanteil geringer sein, während der α -helikale Anteil höher ist. Die ϵ -Untereinheit ist ein Protein praktisch ohne α -Helix Gehalt. Es ähnelt in seinem Spektrum der Superoxid-Dismutase oder dem Concanavalin A, die beide durch einen sehr geringen α -Helix-Gehalt gekennzeichnet sind. Dies zeigt sich auch in der geringen molaren Ellipsität (θ), die unabhängig von der Ungenauigkeit der Bestimmung deutlich unter den Werten der anderen Untereinheiten liegt.

Abb. 7: CD-Spektren der F_1 -Untereinheiten



Fortsetzung Abb. 7 : CD-Spektren der F₁-Untereinheiten

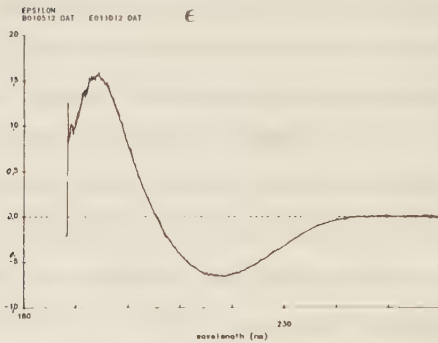


Tabelle 7 : Sekundärstrukturvorhersagen der F₁-Untereinheiten

	α -Helix	β -Faltblatt	turn	unbestimmt
α	40 %	15 %	20-30%	20-30 %
β	43 %	12 %	dto	dto
γ	40 %	15 %	dto	dto
δ	45 %	10 %	dto	dto
ϵ	5 %	40 %	15 %	30 %

Bei dieser Analyse sollen nur Tendenzen aufgezeigt werden. So sind insbesondere die Werte für den turn- und den Anteil an unbekannten Strukturen eine Abschätzung aus dem Vergleich der Referenzproteine und mit einer entsprechenden Unsicherheit behaftet. Die Analyse zeigt aber, daß unter den Bedingungen der HPLC gefaltete oder besser rückgefaltete Proteine eluiert werden, da zur Auftrennung der F₁-ATPase gesättigte Harnstofflösung verwendet werden muß, in der die Untereinheiten keine starre Sekundärstruktur besitzen. Die Strukturberechnungen für die γ -Untereinheit, die weiter unten behandelt werden, ergaben eine hohe Übereinstimmung mit den durch die CD-Spektren ermittelten Werte.

3.3.6. Peptidsequenzen der α -Untereinheit

Die c-DNA-Sequenzen der α - und β -Untereinheit der Hefe- F_1 -ATPase konnten in anderen Arbeitsgruppen ermittelt werden (Takeda et al., 1985, Takeda et al., 1986). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, beinhaltet die DNA-Sequenzierung potentielle Fehlermöglichkeiten, die durch vergleichende DNA- und Proteinsequenzierung behoben werden können. Diese Fehlermöglichkeiten zeigten sich deutlich bei der ersten publizierten Sequenz der β -Untereinheit (Saltzgaber-Muller et al., 1983), wo durch das Überlesen eines einzelnen Nukleotids ein Bereich mit einer völlig falschen Sequenz ermittelt wurde. Durch die N-terminale Sequenz und die anderen proteinchemischen Daten kann die revidierte c-DNA-Sequenz der β -Untereinheit im Wesentlichen bestätigt werden.

Der N-Terminus der reifen, aus der F_1 -ATPase isolierten β -Untereinheit entspricht Position 32 der DNA-Sequenz. Daraus folgt, daß das Signalpeptid, das zum Import ins Mitochondrion benötigt wird (Reid, 1985), 31 Aminosäuren lang ist.

Die α -Untereinheit hat einen Precursor von 39 Aminosäuren. Die nachfolgenden 16 Aminosäuren sind offenbar für die Funktion der Untereinheit nicht von Bedeutung. Sie können proteolytisch abgespalten werden, ohne daß eine inaktive ATPase gebildet wird.

Um für die α -Untereinheit eine Korrelation zwischen DNA- und Proteinsequenz zu erhalten, wurden Partialsequenzen der α -Untereinheit aus einer tryptischen Spaltung ermittelt. Um diese Korrelation zu erhalten, war es nicht notwendig, möglichst alle Peptide zu sequenzieren. Es wurden deshalb nur diejenigen analysiert, die eindeutige Ergebnisse versprochen.

Folgende Sequenzen wurden ermittelt; sie lassen sich alle der DNA-Sequenz zuordnen.

Tabelle 8: Peptidsequenzen der tryptischen Spaltung der α -Untereinheit.

Peptidsequenz	entspricht Position der DNA-Sequenz
GVSDEANLNE	55- 64
TGNIVDVPG	128-137
VVDALGNP	144-151
GPIDAAG	156-162
SVXEPVQTGL	178-187
AVDALVPIG	189-197
ELIIGD	202-207
STVAQLV	248-254
EAYPGDVFY	328-337
LLER	342-345
LFLAQY	462-467

Zusammen mit dem durch Carboxypeptidasespaltung ermitteltem C-Terminus F-T-A-V- (E. Fassold, unveröffentlichte Resultate) bestätigen diese Daten die Richtigkeit der Zuordnung der DNA-Sequenz der α -Untereinheit.

3. 3. 7. Sequenzermittlung der γ -Untereinheit

3. 3. 7. 1. Methodik der manuellen Sequenzermittlung

Zur Ermittlung der Primärstruktur der γ -Untereinheit wurden nur enzymatische Spaltungen angewandt, die kleine Kettenlängen der Spaltpeptide liefern. Die besten Erfahrungen beim manuellen Sequenzieren wurden bei Kettenlängen von 10-15 Aminosäuren gemacht. Das längste in dieser Arbeit sequenzierte Peptid umfasste 28 Aminosäuren. Dieses Vorgehen unterscheidet sich von der automatisierten Sequenzie-

rung, bei der möglichst große Spaltprodukte gesucht werden, die überwiegend durch chemische Spaltungen erhalten werden.

Jede chemische Spaltung bewirkt eine mehr oder weniger starke Modifikation der Spaltpeptide. Dies geschieht einmal durch unspezifische Hydrolyse unter den meist drastischen Reaktionsbedingungen oder durch das Auftreten von Sekundärreaktionen wie z. B. die Halogenierung von Tyrosin bei der Spaltung mit o-Iodosobenzoessäure oder Veresterungen von Ser und Thr durch organische Säuren. Cys ist sowohl unter den Bedingungen für die chemischen Spaltungen als auch bei der Sequenzierung nur nachweisbar, wenn es in ein stabiles Derivat überführt worden ist.

Im Gegensatz hierzu sind enzymatischen Proteolysen spezifisch und schonend. Sie erfolgen gewöhnlich in fast neutraler, wässriger Lösung, so daß unspezifische Nebenreaktionen nicht auftreten. Das größte Problem beim Arbeiten mit enzymatischen Spaltprodukten liegt in der großen Zahl von Produkten. Dadurch wird zum einen die Aufarbeitung schwieriger, ein Problem, das durch die Anwendung der HPLC gut zu lösen ist. Ein weiteres Problem für die Sequenzermittlung ist die große Anzahl der benötigten überlappenden Fragmente. Es müssen also mehrere verschiedene Proteasen angewendet werden.

Für die Spaltung der γ -Untereinheit wurden 3 Typen von Proteasen benutzt:

1. Proteasen, die hinter Lys und Arg spalten (Clostripain, Trypsin)
2. *S. aureus* Protease, die hinter Glu (und Asp) spaltet
3. Proteasen, die an neutralen Resten spalten (Thermolysin, Chymotrypsin)

Die Spezifität der Proteasen ist unterschiedlich. Clostripain, Trypsin und *S.aureus* gehören zu den gruppenspezifischen Proteasen, sie spalten die Peptidbindungen ausschließlich C-terminal von positiv (Clostripain, Trypsin) und negativ (*S.aureus*-Protease) geladenen Aminosäuren. Bevorzugt wird hinter Arg bzw. Glu, den idealen Substraten dieser Proteasen, gespalten. Nur ausnahmsweise bilden Lys- bzw. Asp-Peptidbindungen Substrate dieser Proteasen. Trypsin ist ein Sonderfall, auf den weiter unten näher eingegangen wird.

Ganz anders ist der Mechanismus der Proteasen, die an neutralen Resten spalten. Eigentlich liegt bei ihnen keine Aminosäurespezifität, sondern eine Sequenzspezifität vor, bei der die Umgebung der Spaltstelle wichtiger ist als die Aminosäure, an der gespalten wird. So kam es bei der chymotryptischen Spaltung vor, daß nicht immer hinter Phe, dem idealen Substrat, gespalten wurde, sondern auch an anderer Stelle, z. B. an einer Asn-Peptidbindung.

3.3.7.2. Trennung der proteolytischen Spaltprodukte

Als Laufmittel für die hochdruckchromatographische Trennung wurden Gemische von Wasser und Acetonitril mit je 10 mM TFA verwendet, dadurch beträgt die Basisliniendrift bei 214 nm nur 0,05 OD beim Übergang von 0 % auf 50 % Acetonitril. Die zum Nachweis benutzte Wellenlänge liegt zwar bereits auf der Flanke der Peptidbindungsabsorption ($\lambda_{\max} \approx 190$ nm für eine Peptidbindung), da aber auch Dipeptide ohne zusätzlichen, bei dieser Wellenlänge absorbierenden Chromophor (LK, IK) sicher durch ihre UV-Absorption identifiziert werden konnten, ist nicht damit zu rechnen, daß Peptide auf Grund ihrer geringen Absorption übersehen wurden. Die Verwendung von TFA mit ihrer Tendenz zur Ionenpaarbildung führte dazu, daß selbst stark basische Peptide (z.B. ISARRN) als scharfe Peaks eluiert wurden.

Auf eine Rechromatographie von Mischfraktionen wurde weitgehend verzichtet, da jede Rechromatographie mit einem großen Materialverlust verbunden ist, der umso größer wird, je weniger Peptid vorhanden ist. Generell ließ sich feststellen, daß die Ausbeuten umso geringer waren, je hydrophober das Peptid war. So wurden z. B. bei der S.aureus-Spaltung der Cys-haltigen Peptiden nur insgesamt 6 nmol erhalten, obwohl rd. 30 nmol eingesetzt wurden.

Die Methode der Sequenzierung ist oben beschrieben (s. Seite 10). Obwohl konzentrierte wässrige HCl ein schlechtes Lösungsmittel für Peptide ist und zudem eine erhöhte Tendenz zur Hydrolyse der Peptidbindung zeigt, hat ihre Verwendung entscheidende Vorteile bei der Sequenzierung kurzer Peptide. Sie dehydratisiert Ser und Thr

nur partiell, so daß eine sichere Identifikation dieser PTII-Aminosäuren möglich ist. Zudem sind die Peptid-Hydrochloride wesentlich hydrophiler als die entsprechenden Trifluoroacetate, wodurch die extraktiven Verluste reduziert werden können. Deshalb konnten auch hydrophobe Peptide häufig bis zum Ende durchsequenziert werden. Die verstärkte Hydrolyse, die die N-terminale Sequenzanalyse der Untereinheiten limitierte, spielt bei den Peptiden keine Rolle, allerdings macht sie sich bei der Sequenzierung von Asn und insbesondere Gln bemerkbar. 30 % bis 70 % der Amide werden hydrolysiert.

3.3.7.3. Analyse der tryptischen Spaltung

Trypsin zeigt als Protease eine Besonderheit: es kann aus drei Formen bestehen (Smith und Shaw, 1969). Während α - und β -Trypsin absolut spezifisch für Arg- und Lys-Bindungen sind, zeigt Pseudotrypsin chymotryptische Aktivität. Es entsteht durch Autolyse und ist besonders in kristallinem Trypsin, das hier verwendet wurde, vorhanden.

Während also immer C-terminal zu Lys und Arg gespalten wurde, entstanden durch pseudotryptische Aktivität auch andere Fragmente z. B.:

34, 35 : TLANQML
 35 : TAMAQLY aus -DLFEYTLANQMLTAMAQLYAAEISAR-
 40 : DLFEY
 19 : AAEISAR
 41 : ISIFY
 oder
 YNDPVSSL aus -ISIFYNDPVSSLSFEPSEK-
 33 : SFEPSEK

Tabelle 9 : Peptidsequenzen der tryptischen Spaltung

2 : NAETK	3 : IK
4 : LK	5 : TMK
6 : AVR	7 : SIK
9 : LSK	11 : ISAK
ITK	13 : ATLK
15 : NAMDNASK	NIEK
16 : THIPNNIK	16a: IVASTR
17 : AGTYPK	19 : AAEISAR
20 : EVEMR	23 : NAGDMIR
25 : TAMAQL	27 : TIEQSPSF
28 : NLDVEATETGAPLE	31 : GLCGSIN
32 : HLNDQPADIVT	LSINGIGK
LLQVMK	MQSVM
33 : SFEPSEK	34 : TLANQML
YNDPVSSL	FMDEAEQLF
FEIDTDANVP	35 : DAPTFQESALIADK
36 : FMDEAEQLFY	38 : YSILYNR
39 : TIEQSPSFGXFEIDTDA	
40 : DLFEY	41 : YNDPVSSLS
47 : TLANQMLTAMAQLY	ISIFY
ISIFYNDPVSSLS	54 : QAVITNELVDIITG

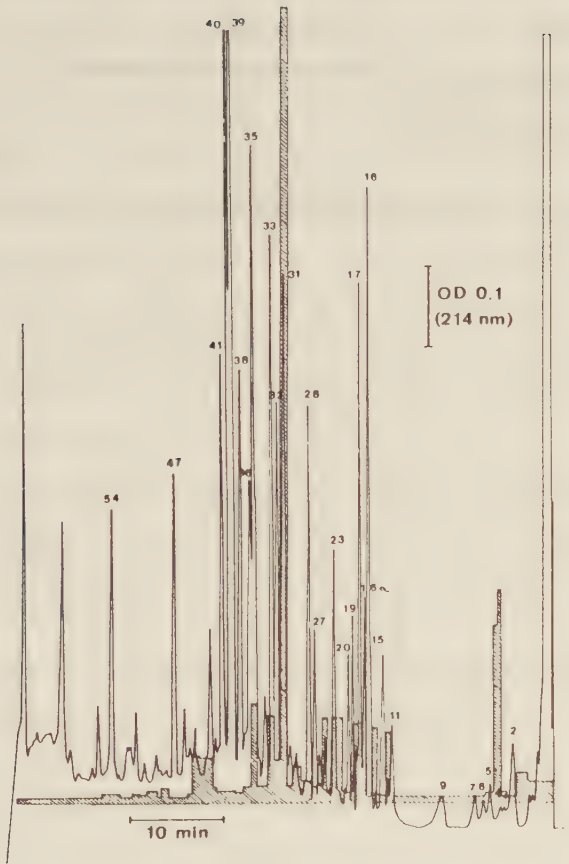


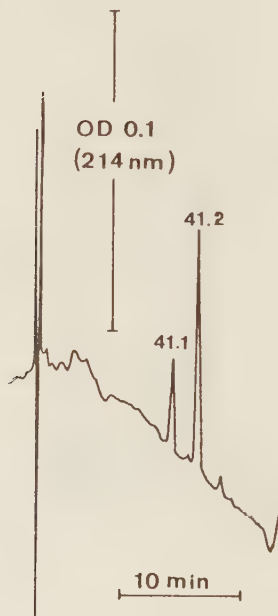
Abb. 8: Chromatogramm der tryptischen Spaltpeptide der γ -Untereinheit (Nummerierung wie in Tab. 9)

Beim Auflösen in 8 M Harnstoff und anschließendem Verdünnen entstand eine feine Suspension der γ -Untereinheit. Die geringe Konzentration und die Suspension bedingen eine langsame Spaltung, so daß eine Reaktionszeit von 4 Stunden gewählt wurde. Die Lösung klärte sich zwar im Verlauf auf, es blieb jedoch immer noch ein Teil

ungelöst. Durch die Zugabe von Harnstoff wurde auch dieser Anteil nach der Spaltung in Lösung gebracht.

Die Fraktionen 31, 41 und 47 der tryptischen Spaltung wurden, wie auf S.16 beschrieben, rechromatographiert.

Abb. 9 : Rechromatographie der Fraktion 41 der tryptischen Spaltung.



Die Bestimmung der Position des Cys in der Aminosäuresequenz erfolgte nach ^{14}C -Carboxymethylierung. Die schraffierten Flächen in Abbildung 7 entsprechen der Radioaktivität, die in diesen Fraktionen gefunden wurden. Dazu wurden Aliquots von 5 % gemessen. Die Hauptmenge ist eindeutig in Fraktion 31. Auffällig ist der hohe Untergrund, besonders in dem Bereich, in dem viel Peptid eluiert wird, sowie der sehr hohe ^{14}C -Gehalt in den Fraktionen 3 und 4, der wahrscheinlich auf freie Jodessigsäure bzw. ihr Hydrolyseprodukt, die Hydroxyessigsäure zurückzuführen ist. Der hohe Unter-

grund im Peptidbereich ist wahrscheinlich auf Modifikationen z.B. an Met oder Lys zurückzuführen. Wegen des im Vergleich zum Cys geringen radioaktiven Einbaus konnte allerdings keine Zuordnung zu einzelnen Fragmenten gezogen werden.

Bei der Carboxymethylierung für die tryptische Spaltung wurde nach der Methode von Crestfield et al. (1963) vorgegangen. Dazu wurde das Protein in 15 ml Harnstofflösung (s. Seite 13) mit 1,44 mmol Jodessigsäure umgesetzt und an Sephadex G-75 mit 50 % iger Essigsäure als Lösungsmittel entsalzt. Dieser Entsalzungsschritt erwies sich bei den geringen Proteinmengen als nachteilig, da ein Teil (20 % Substanzverlust) der in Harnstoff gelösten Probe auf der Säule ausfiel. Außerdem ist der sehr hohe Überschuß von Jodessigsäure zu Cys (rd.30000 : 1) mit einer stärkeren Modifikation anderer Gruppen verbunden.

Bei allen nachfolgenden Carboxymethylierungen wurde deshalb die im Methodenteil beschriebene Modifikation angewandt. Dadurch wurden Substanzverluste vermieden, und, obwohl auch hierbei Nebenprodukte erschienen, deren Anteil deutlich reduziert.

Die Position des Cys ergab sich durch die Verteilung der Radioaktivität im Extrakt der einzelnen Sequenzierungsschritte von Fraktion 31:

Sequenzschritt	1	2	3	4	5	6
Cpm(10 % des Extrakts)	10	34	711	204	48	31

Der Verlauf der Radioaktivität zeigt, daß im 1. und 2. Schritt nur die Hintergrundaktivität gemessen wird. Im dritten Schritt findet sich die Hauptmenge, im Schritt 4 wird nur noch rd. 1/3 der Radioaktivität gefunden, danach sinkt die Radioaktivität wieder auf den Hintergrundwert ab. Das heißt, daß sich das Cys in diesem Peptid an der dritten Position befindet. Die Extraktionsmethode bedingt, daß saure PTC-Aminosäuren nicht vollständig extrahiert werden; daraus resultiert die relativ hohe Aktivität in Schritt 4. Daneben erschien bei der Analyse der Peptidsequenz in Schritt 3, weniger auch in Schritt 4, ein Signal in der Position von CM-Cys im HPLC-Chromatogramm.

3.3.7.4. Spaltung mit Clostripain

Abb. 10: Chromatogramm der Clostripain-Spaltprodukte
(Nummern wie in Tab. 10)



Tabelle 10: Peptidsequenzen der Clostripain-Spaltung

8 : AVR	9 : LSK
LK	ITK
TMK	15 : THPNNIK
16 : IVASTR	AEKAKISAK
17 : AGTYPK	21 : NIEKITK
22 : NAGDMIR	23 : ATLKEVEMR
24 : ATLKEVEMR	26 : TMKIVASTR
28 : SIKNIEKITK	29 : NAMDNASKNAGDMIR
33 : GLCGSI	34 : MQSVM
35 : HLNDQPADIV	LLQVMK
48 : TIEQSPSF	37 : YSILYNR
55 : NAETKNLDVEATETG	51 : THPNNIKLSING
67 : AGTYPKISIFYNDPVSSLSFEPSE	LKSIKNIKITKTMK
89 : DLFEYTLANQMLTAMAQLYAAEISAR	81 : QAVITNELVDIITGASSLG

Die Spaltung der γ -Untereinheit mit Clostripain zeigt die Spezifität dieser Protease: Sie ist streng spezifisch für positiv geladene Seitenketten mit einer ausgeprägten Präferenz für Arg. In keinem Fall wurde hinter His oder irgendeiner anderen Aminosäure gespalten, einige allerdings nur partielle Spaltungen erfolgten hinter Lys, aber alle Arg-Bindungen wurden quantitativ gespalten, auch Arg-Arg-Bindungen.

Um möglichst einige Lys-Bindungen zu spalten und dadurch kleinere Fragmente zu erhalten, wurde für diese Spaltung eine sehr lange Reaktionszeit angewendet. Bei kürzerer Reaktionszeit sollte die Protease jedoch ausschließlich an Arg spalten. In diesem Fall stellt sie eine Alternative zur selektiven Fragmentierung von Proteinen dar, da Arg zu den selteneren Aminosäuren gehört.

Clostripain besitzt als Protease alle Vorzüge des Trypsin. Es ist stabil gegen Harnstoff bis ca. 4 M, es spaltet auch in Suspension und unter sehr milden, reduzierenden Bedingungen. Zudem führt Autolyse, sollte sie stattfinden, zu inaktiven Produkten, so daß auch sehr lange Reaktionszeiten angewandt werden können.

3.3.7.5. Spaltung mit S.aureus Protease

Abb. 11: Chromatogramm der S.aureus Spaltung (Nummerierung wie in Tab. 11)

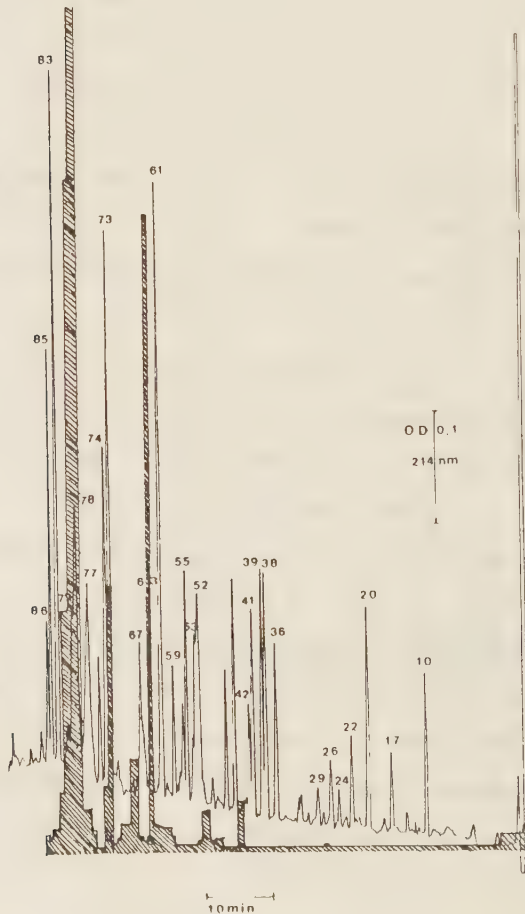


Tabelle 11: Peptidsequenzen der *S. aureus* Spaltung

10 : TGAPLE	17 : ATLKE
20 : KAKISAKFMDE	22 : TKNLDVE
24 : ATLKEVE	26 : TKNLDVEATE
29 : SALIAD	36 : QLFYKNAE
38 : MRLKSIKNIE	39 : KITKTMKIVASTRLSKAE
41 : QSPSFGXFE	42 : PSEKPIF
52,53: IDTDANVPRDLFE	55 : LVDIITGASSLG
59 : NASKNAGMIR	61 : ISARRNAMDNASKNAGMI
63 : LIVAISTDKGLCGSINGS	67 : IVTIKVIG
73 : YTLANQMLTAMAQLYAAE	74 : KLLQVMKAGTYPK
78,79: LIVAITSDKGLCGSINGSLAKAV	77 : TGAPLERKELIVAI
83,85,86: SALIADKLLQVMKA	

S. aureus Protease ist ebenfalls eine streng Seitengruppen-spezifische Protease. Unter den angewandten Reaktionsbedingungen spaltete sie fast ausschließlich hinter Glu, nur in zwei Fällen (Fr. 29 und Fr. 67) konnte eine Proteolyse hinter einer Asp-X Bindung gefunden werden. In keinem Fall wurde eine unspezifische Proteolyse beobachtet. Auffallend ist allerdings ihre geringe physikalische Stabilität. Bereits durch 10 % Ethanol wurde sie vollständig inhibiert und ihre Stabilität gegenüber Harnstoff limitiert ihre Anwendung. Im Gegensatz zum beschriebenen Verhalten (Drapeau, 1977) wurde sie durch 2 M Harnstoff praktisch vollständig inaktiviert und selbst in 0,5 M Harnstoff war sie wesentlich weniger aktiv als in reinem Puffer. Hinzu kommt, daß sie suspendierte Proteine schlecht spaltet.

Die benutzten Reaktionsbedingungen sind daher ein Kompromiß aus den Eigenschaften der Protease und dem Löslichkeitsverhalten der γ -Untereinheit. Wegen der geringen Stabilität der Protease wurden auch oft nur partielle Spaltprodukte gefunden wie z. B. in den Fraktionen 24, 26, 42, 77 sowie 78/79 und 85/86. Auf Grund

ihrer einzigartigen Affinität zu den Carboxyl-Seitengruppen konnte allerdings trotz der Nachteile auf diese Protease nicht verzichtet werden.

Auch die Verteilung der ^{14}C -Markierung zeigt dieses unvollständige Spaltverhalten. Die Markierung wird in 3 Fraktionen gefunden, zumindest die Peptide in den Fraktionen 63 und 78/79 enthalten Cys, wobei das Peptid in Fraktion 63 ein partielles Spaltprodukt von Peptid 78/79 ist.

3.3.7.6. Spaltung an neutralen Aminosäuren

Tabelle 12: Peptidsequenzen der chymotryptischen Spaltung

17 : EY

19 : RL

22 : KIVASTR

23 : SVM

25 : AAEISARR

35 : TAMAQLY

38 : IADKL

43 : KIVASTRLSKAEK

KIVASTR

46 : DNASKNAGDMI

44 : RTHIPNNIKL

47 : ATLKEVEM

49 : SILY

50 : AMDNASKNAGDMIRKY

51 : KSIKNIKKITKM

52 : KNAETKNLDVEATETGAPL

53 : YNDPVSSL

IADKLLQVMKAGT

55 : TLANQML

56 : YKNAETKNLDVE

58 : AAEISARRNAMDN

60 : SFEPSEKPIF

61 : IVAITSDKGLCGS

62 : AKTIEQSPSF

63 : IFAKTIEQSPSF

65 : SKAEK

67 : SINGIGKDAPTFQESAL

69 : SKAEKAKISAKFMDEAEQLF

71 : IVAITSDKGLCGSINGSL

72 : AKAVRRHILND

73 : EIDTDANVPRDL

76 : KAGTYPKISIF

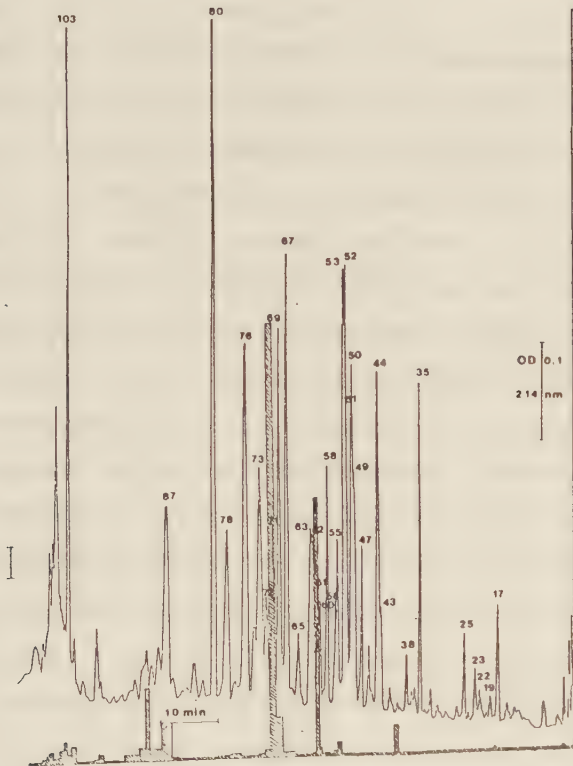
78 : EIDTDANVPRDLF

80 : SFEPSEKPIFIFAKTIEQSPSF

87 : AKAVRRHILNDQPADIVTIKVIG

103 : NRTRQAVITNELVDIITGASSLG

Abb. 12: Chromatogramm der chymotryptischen Spaltung (Nummerierung wie Tabelle 12)



Proteasen, die an neutralen Aminosäuren spalten, besitzen nicht die Spezifität der Proteasen, die an geladenen Resten spalten. Hat man, z. B. beim Clostripain auch bei längeren Inkubationszeiten nur eindeutige Spaltprodukte erhalten, so ist dies bei den Proteasen wie z. B. Chymotrypsin nicht mehr der Fall. Hier werden im Prinzip alle Bindungen gespalten, allerdings mit sehr unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeit.

Aus diesem Grunde wurden nur sehr kurze Reaktionszeiten angewandt, wobei auch bewußt partielle Spaltungen in Kauf genommen wurden. Da trotzdem mit vielen, sehr kurzen Peptiden zu rechnen war, wurden sehr flache Gradienten mit einem niedrigen Acetonitrilgehalt benutzt, bei der Thermolysinspaltung z. B. nur bis zu 20 % Acetonitril.

Die Sequenzabhängigkeit der Proteasen zeigt sich sehr deutlich bei der chymotryptischen Spaltung. Chymotrypsin spaltet bevorzugt hinter aromatischen Aminosäuren, insbesondere hinter Phe. Trotzdem wird ein Peptid wie in Fraktion 80 erhalten, in dem 3 X-Phe-X- Bindungen nicht gespalten wurden.

Um das zu erwartende, komplexe Gemisch durch proteolytische Fremdaktivitäten nicht noch weiter zu komplizieren, wurde bei der chymotryptischen Spaltung Trypsin-Inhibitor zugesetzt. Es wurden danach auch keine tryptischen Spaltpeptide mehr identifiziert. Bei den Peptiden, in denen Lys oder Arg C-terminal sequenziert wurden, kann aus der Position im Chromatogramm geschlossen werden, daß das entsprechende Peptid wesentlich länger ist. Die Sequenzterminierung ist hierbei auf methodische Probleme bei der Sequenzierung zurückzuführen.

Trotz aller partieller Spaltfragmente ist Chymotrypsin selektiver als Thermolysin. Bei der Auftrennung der thermolytischen Spaltprodukte entstand ein z.T. so komplexes Peptidgemisch, daß eine Sequenzierung und Identifizierung trotz ausreichender Mengen nicht möglich war. Nichtsdestoweniger konnten einige, für die Gesamtsequenz sehr wichtige, Peptidsequenzen ermittelt werden.

Tabelle 13 : Peptidsequenzen der thermolytischen Spaltpeptide

7 : LND	9 : INGS
15 : ITSDKG	18 : LAKA
22 : FEPSEKP	23 : LCGS
24 : LSKAEK	FGW
25 : ISARRN	IVAST
26 : YAAE	27 : LNDQP
29 : GTYPK	30 : VEATETGA
31 : AGTYPK	ITKTM
32 : IGDKDAPTFQ	33 : LNDQPAD
36 : MKIVAST	37 : FYKNAETKN
40 : LFEYT	MRTHPNN
AMDNASKNAGDM	41 : LTAMAQ
42 : YNDPVSS	IDTDANVPRD
44 : VMKAGT	47 : LKEVEMRLKS
56 : IGDKIKMQS	IADK
57 : LNDQPADIVTIK	ILYNRTRQA
61 : ISIFYNDVSS	62 : LSFEPSEKP
65 : FEIDTDANVPRD	66 : LDVEATETGAP
67 : LVDIITGASS	

Abb. 13 : Chromatogramm der thermolytischen Spaltprodukte (Nummerierung wie in Tabelle 13)



3. 7. 7. 7. Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit

Die Zuordnung der Peptidsequenzen zur Gesamtsequenz gelang eindeutig auf Grund der überlappenden Segmente. Tabelle 14 zeigt die überlappenden Peptidsequenzen und die daraus resultierende Gesamtsequenz. Dargestellt sind nur die relevanten Sequenzen, nicht Partialsequenzen eines längeren Peptids derselben Spaltung.

Tabelle 14; Aminosäuresequenz der γ -Untereinheit der Hefe-ATPase

1
ATLKEVEMRL KSIKNIEKIT KTMKIVASTR LSKAEKAKIS AKFMDEAEQL



51
FYKNAETKNL DVEATETGAP LERKELIVAI TSDKGLCGSI NGSLAKAVRR



101
HLNDQPADIV TIKVIGIGDK IKMQSVMRTH PNNIKLSING IGKDAPTFQE



151
SALIADKLLQ VMKAGTYPKI SIFYNDPVSS LSFEPSEKPI FIFAKTIEQS



201

PSFGWFEIDT DANVPRDLFE YTLANQMLTA MAQLYAAEIS ARRNAMIDNAS



251

KNAGDMIRKY SILYNRTROA VITNELVDII TGASSLG



dargestellt sind die Peptide der tryptischen (1) , chymotryptischen (2) ,S. aureus (3) , Clostripain (4) und Thermolysin-Spaltung(5)

4. Diskussion

Eines der ungelösten Probleme der Bioenergetik ist der Mechanismus der ATP-Synthese durch die H^+ -ATP-Synthetase. Dieses komplexe oligomere Protein entzog sich bislang einer detaillierten Analyse auf der molekularen Ebene, weil die Methoden zur Aufklärung der Eigenschaften von Membranproteinen und membranassoziierten Proteinen erst in neuerer Zeit zugänglich wurden. Dieser Fortschritt wurde möglich vor allen Dingen durch die moderne Entwicklung der Molekulargenetik, aber auch durch methodische Verbesserungen der Proteinchemie, die an Systemen wie z. B. dem Bakteriorhodopsin gewonnen wurden. Trotz dieser Fortschritte ist man auch heute noch weit entfernt von einem Verständnis des Mechanismus. Es ist daher notwendig, die Proteine kennenzulernen und ihre Eigenschaften besser zu verstehen. Auch die Kristallstrukturanalyse, die allerdings im Falle der H^+ -ATPase noch nicht vorliegt, ist auf die Kenntnis der Primärstruktur und die prinzipiellen Vorgänge bei der Katalyse angewiesen. Bei der Sequenzermittlung von Untereinheiten eines Enzymkomplexes sind mehrere Arbeitsschritte notwendig. Der primäre Schritt ist die Isolierung eines reinen Komplexes. Daran schließt sich die Präparation der Untereinheiten an. Als abschließender Schritt ist die Sequenzermittlung anzusehen.

Auch wenn die beiden ersten Arbeitsstufen auf den ersten Blick ähnlich scheinen, handelt es sich hierbei um andersartige Vorgehensweisen. Bei der Isolation eines reinen Enzymkomplexes muß das physiologisch aktive System erhalten bleiben, während bei der Dissoziation in die Untereinheiten diese Aktivität meist völlig verloren geht. Bei der Isolation von Untereinheiten kann daher auch unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet werden, während das Ziel der Komplexisolierung ist, unter möglichst schonenden Bedingungen eine reine Präparation zu erhalten. Dies alles sind Prozesse, bei denen auch das Verhalten der Proteine kennengelernt wird.

4.1. Methodenkritik

Einige der benutzten Methoden bedürfen einer kritischen Betrachtung, um ihre Anwendung zu erläutern. Die CD-Spektroskopie zur Bestimmung der Sekundärstruktur der isolierten F₁-Untereinheiten ist sowohl hinsichtlich ihrer prinzipiellen Aussagekraft als auch hinsichtlich der experimentellen Durchführung kritisch zu betrachten. In der Praxis zeigt sich, daß die heutzutage benutzten Auswertemethoden (s. Seite 33) häufig nicht exakte Ergebnisse liefern, so daß in dieser Arbeit der visuelle Spektrenvergleich mit Referenzspektren zur Auswertung bevorzugt wurde. Dadurch sind allerdings die Unsicherheiten bei der Vorhersage des turn-Anteils und des Anteils an unbestimmbaren Strukturen gegeben.

Auch zur Messung des Circular dichroismus müssen einige kritische Anmerkungen gemacht werden. Die Frage ist, ob die gefundenen Strukturen den nativen ähnlich sind, denn die CD-Spektren wurden unter drastischen Bedingungen aufgenommen. Der pH-Wert der Lösungen liegt bei etwa 3,5 bis 4, so daß ein Teil der Carboxylgruppen bereits protoniert ist. Zudem ist die Sekundärstruktur eines Proteins stark abhängig von dem Lösungsmittel, so daß die geringere Polarität des Lösungsmittels möglicherweise eine andere Struktur als im nativen Zustand erwarten läßt. Diese Einwände können berechtigt sein. Allerdings konnten die β -, δ - und ϵ -Untereinheit in 10 mM K-Phosphat bei pH 7 in der Anwesenheit von Mg und ATP in Lösung gehalten werden, ohne daß sich das CD-Spektrum hierbei signifikant änderte. Sicherlich ändern sich beim Übergang vom sauren zum neutralen oder schwach alkalischen pH in einem Protein die Struktur kleiner Bereiche, vor allen Dingen an der Oberfläche. Doch scheinen diese Änderungen, so gravierend sie für die Funktion des Proteins sein können, sich in der für die Sekundärstrukturanalyse makroskopische Methode der CD-Messung nicht wiederzuspiegeln, zumindest nicht in dem dargestellten Beispiel.

Die Sequenzanalyse wurde nach der Methode von Tarr (Tarr, 1975, 1982) durchgeführt. Dazu sollten einige Kommentare gegeben werden. Die Ausbeute an PTH-Aminosäuren ist von der betrachteten Aminosäure abhängig. Cys kann nur deriva-

tisiert identifiziert werden. Trp wird unter den Bedingungen sehr stark zerstört, die Identifizierung wird zusätzlich dadurch erschwert, daß das PTH-Derivat im HPLC-System fast koeluiert mit DPTU, das im Laufe der Analyse sehr stark zunimmt. Bei Ser und noch mehr bei Thr sind die Ausbeuten wegen der Dehydratisierung relativ gering. Diese Aminosäuren können allerdings gerade durch ihre Dehydratisierungsprodukte gut identifiziert werden. Im Gegensatz zur Literatur (Tarr, 1975) werden Asn und insbesondere Gln relativ stark hydrolysiert, rund 50 % werden als PTH-Glu oder PTH-Asp identifiziert. Zusätzlich bewirkten diese Aminosäuren häufig eine partielle Blockierung des Peptids. Die größten Probleme bereitete die Identifizierung von His und Arg, die trotz der Doppel-pH-Extraktion nur in sehr geringen Ausbeuten anzutreffen sind. Alle anderen Aminosäuren lassen sich ohne Probleme sequenzieren. Auch Pro bereitete, selbst wenn in seltenen Fällen einmal keine vollständige Spaltung erfolgte, keine Schwierigkeiten. Die nachfolgenden Sequenzen waren in allen Fällen klar zu erkennen.

Alle diese Probleme waren nicht grundsätzlicher Art. Wenn das sequenzierte Peptid in ausreichender Menge vorhanden war (im allgemeinen reicht ca. 1 nmol) , konnten auch Peptide mit problematischen Aminosäuren gut sequenziert werden. Wesentlich störender waren Effekte, die auf die Lösungsmittel zurückzuführen waren, insbesondere wenn im Laufe der Zeit sich Peroxide im Ethylacetat bildeten. Dies führte häufig zu einer vollständigen Blockierung der Sequenz innerhalb von drei oder vier Schritten.

Alle Partialsequenzen, bis auf diejenigen um die Aminosäuren 72-75 und 120-122, sind durch Überlappungen klar definiert. Zudem wurden alle Peptide mehrmals sequenziert. Die Positionierung dieser zwei nicht durch andere Überlappungen gesicherten Peptide bereitete keine Unsicherheiten, da die Peptide eindeutig sequenziert werden konnten. Daneben waren der N- und der C-Terminus unabhängig von den Spaltpeptiden sequenziert worden, so daß die Sequenzermittlung eindeutig ist. Auch der Sequenzvergleich mit den anderen bekannten Primärstrukturen der γ -Untereinheiten ergab die Richtigkeit dieser Zuordnung.

4.2. Heterogenität der ATPase

Die Verwendung kommerzieller Hefe birgt große Probleme in sich. Das SDS-Gel (Abbildung 4, S. 22) zeigt bereits den hohen Anteil an Fremdpeptiden in einer ATPase-Präparation aus kommerzieller Hefe. Durch die Zucht von Reinstammhefe im Fermenter unter kontrollierten Wachstumsbedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle wird der Anteil an Fremdpeptiden wesentlich reduziert. Da sowohl für kommerzielle Hefe als auch für Reinstammhefe die gleichen Aufarbeitungsbedingungen benutzt wurden, muß die Ursache für die Fremdproteine in den Kulturbedingungen oder in einer genetischen Heterogenität der Population liegen. Die variablen Verhältnisse dieser Nebenprodukte sprechen für eine physiologische Mischpopulation. Diese kann durch Unterschiede im Kulturmedium, durch jahreszeitliche Schwankungen, durch eine zu späten Ernte, wobei die Hefe bereits in der stationären Phase ist oder durch andere, unbekannte äußere Faktoren begründet sein. Die Abhängigkeit der Präparate aus kommerzieller Hefe von jahreszeitlichen Einflüssen wurde häufig auch an wechselnden Ausbeuten festgestellt.

Durch Verwendung von Reinstammhefe unter kontrollierten Bedingungen entstehen F_1 -Präparate gleichbleibender Qualität. Wie Abbildung 4 zeigt, ist die Anwendung dieser Bedingungen in Bezug auf die Fremdpeptide jedoch nur von quantitativer Bedeutung, nicht von qualitativer. Auch in Fermenter-gezogenen Reinstammhefepräparationen sind Fremdpeptide in Bezug auf die F_1 -ATPase vorhanden, allerdings in wesentlich geringeren und gleichbleibenden Mengen, das heißt diese Peptide sind durch die Kulturbedingungen unterdrückt worden.

Gravierender als diese Verunreinigung der Präparate durch Fremdpeptide ist jedoch die Mikroheterogenität der Untereinheiten. Wie das HPLC-Chromatogramm zeigt, besteht die ϵ -Untereinheit in kommerzieller Hefe aus vier definierten Peptiden gleichen Molekulargewichts (Abbildung 2, S. 19). Wenn diese unterschiedlichen Peptide durch eine posttranslationale Proteolyse des gleichen Präpeptids beim Import ins Mitochondrion oder bei der Bildung des intakten Komplexes entstehen würden, müßte

zwischen der längsten und der kürzesten Peptidkette ein Unterschied von mindestens 3 Aminosäuren bestehen und damit eine Molekulargewichtsdifferenz von rd. 300 Da auftreten. Diese Differenz wäre im SDS-Gel eindeutig zu erkennen. Das bedeutet, daß diese Heterogenität in der Primärstruktur der ϵ -Untereinheit begründet ist, aber nicht durch ein differentielles Prozessieren des Precursors hervorgerufen wird. Dieser Befund läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß in der verwendeten kommerziellen Hefe in Bezug auf diese ATPase eine Mischpopulation verschiedener Hefestämme im Verhältnis von 5 : 2 : 2 : 1 vorhanden ist, wie es bei den verschiedenen ϵ -Untereinheiten gefunden wurde.

Die isoelektrische Fokussierung der anderen Untereinheiten zeigt, daß diese genetisch bedingte Mikroheterogenität bei allen Untereinheiten aus kommerzieller Hefe vorliegt.

Mikroheterogenität wird auch bei den Untereinheiten der Reinstammhefe beobachtet. Während β und γ im Rahmen der Nachweisgrenze homogen sind, tritt bei der α -, δ - und ϵ -Untereinheit Heterogenität auf. Die ϵ -Untereinheit der Reinstammhefe enthält ebenfalls ein Nebenprodukt (Abbildung 2, Seite 19). Auch hier kann nicht bewiesen werden, woher es stammt; bei der N-terminalen Sequenzierung der zweiten ϵ -Fraktion findet sich im 1. Schritt Ala, so daß das 2. ϵ -Polypeptid durch eine Proteolyse des Hauptpeptids entstanden sein kann. In den nachfolgenden Schritten ist keine Aminosäure erkennbar, was bei den geringen Mengen, in denen das zweite ϵ -Peptid erhalten wird, für Trp oder Arg zu erwarten wäre. Der N-Terminus entspricht daher möglicherweise der Sequenz Ala-Trp-Arg-, d. h. im Vergleich zum Hauptpeptid wäre dieses Peptid um die Aminosäure Ser verkürzt. Dies entspräche einer Molekulargewichtsdifferenz von 87 Da, was durchaus innerhalb der Nachweisgrenze liegt. Aber auch wenn es sich dabei um eine genetisch determinierte, andere ϵ -Untereinheit handelt, ist der Maximalanteil an einem fremden Hefestamm mit 8 % so gering, daß er für viele analytische Verfahren keine Rolle spielt.

Auch die δ -Untereinheit ist heterogen, wie das SDS-Gel deutlich zeigt. Die zwei Banden mit einer Molekulargewichtsdifferenz von rd. 500 Da kommen in praktisch

allen F_1 -Präparaten vor, auch in denen aus kommerzieller Hefe. Während sie in den Präparaten aus der Reinstammhefe jedoch in einem konstanten Verhältnis auftauchen, ist ihr Gehalt in den kommerziellen Präparaten unterschiedlich.

Noch komplexer ist das Erscheinungsbild der α -Untereinheit. In der isoelektrischen Fokussierung sind 4 Banden zu erkennen. Durch den Sequenzvergleich mit der bekannten DNA-Sequenz der unreifen α -Untereinheit ergibt sich, daß hier eine Proteolyse beim oder nach dem Import ins Mitochondrion stattfindet (s. Tabelle 6, Seite 33).

Eine weitere denkbare Möglichkeit, die Heterogenität der F_1 -Untereinheiten zu erklären, wäre eine Aggregation der Proteine, wobei ein unterschiedlicher Aggregationsgrad ein unterschiedliches Verhalten erklären würde. Eine heteromolekulare Aggregation kann ausgeschlossen werden, sie würde sich direkt im SDS-Gel erkennen lassen. Ein homomolekulares Assoziat ist ebenfalls auszuschließen, denn ein ϵ -Polymer würde unter den dissoziierenden Bedingungen der HPLC nicht rechromatographierbar sein, während α - oder β -Addukte gar nicht chromatographierbar wären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Verwendung von Reinstammhefe unter kontrollierten Kulturbedingungen eine essentielle Verbesserung in Bezug auf die Reinheit der Untereinheiten mit sich brachte. Auch wenn manche F_1 -Präparate aus kommerzieller Hefe in Hinblick auf die makroskopische Reinheit ähnlich einheitliche Produkte liefern (s. Abbildung 2, Seite 19), ist dies nicht der Regelfall. Wie erwähnt, wurden Peptide (62 kDa und 45 kDa) gefunden, die z. T. in fast stöchiometrischen Mengen auftraten. Aber auch der Anteil an den immer vorhandenen Nebenbanden im Bereich zwischen 30 kDa und 20 kDa wurden drastisch reduziert. Dies alles ist jedoch nicht der für eine proteinchemische Analyse wichtige Fortschritt. Entscheidend ist, daß nun genetisch einheitliche Proteine mit definierten Eigenschaften zur Verfügung stehen. Die noch vorhandene Heterogenität der α -, δ - und ϵ -Untereinheiten im Reinstammpräparat ist nicht durch die Anwesenheit verschiedener Stämme, sondern wahrscheinlich durch eine unterschiedliche Reifung der Untereinheiten bedingt.

4. 3. Ermittlung der N-Termini der reifen Untereinheiten

Die terminalen α -Aminogruppen aller Untereinheiten sind frei, in keinem Fall war der N-Terminus blockiert. Dies steht im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen (Todd et al., 1980), wobei die beobachtete Blockierung der Untereinheiten auf die dauernde Anwesenheit von Harnstoff bei allen Isolierungsschritten zurückzuführen ist. Bei der hier beschriebenen Isolierung erfolgten nur sehr kurze Kontakte mit Harnstoff.

Der N-Terminus der β -Untereinheit beginnt in Position 32 bzw. 34 der DNA-Sequenz, abhängig davon, welche der publizierten c-DNA-Sequenzen (Saltzgeber Muller et al., 1983; Takeda et al., 1986) sich als richtig herausstellen wird. Die α -Untereinheit wird ab Aminosäure 40 des Precursors prozessiert.

Die Versuche, den N-Terminus der α - und β -Untereinheit aus der DNA-Sequenz vorherzusagen (Takeda et al., 1985; Takeda et al., 1986), zeigen, daß diese Frage ohne proteinchemische Analyse nicht zu beantworten ist. Kein Homologievergleich führte zu einem richtigen Ergebnis. Der Versuch, durch ein in vitro-Translationssystem die Spaltstelle zu ermitteln (Vassarotti et al., 1987), lieferte ebenfalls ein falsches Ergebnis. Dabei wurden zum Import des Precursors der β -Untereinheit die extrahiert Matrixprotease benutzt, obwohl zum Import eine energetisierte Membran notwendig ist (Gasser et al., 1982; Schleyer et al., 1982).

Die N-terminale Heterogenität der α -Untereinheit deutet darauf hin, daß die Reifung des Protein nicht unbedingt positionsspezifisch erfolgt. Es kann hier nicht gesagt werden, ob diese Unspezifität auf die Matrixprotease (McAda und Douglas, 1982) oder irgendeine andere mitochondriale Protease zurückzuführen ist. Der N-Terminus der α -Untereinheit läßt sich leicht proteolytisch, z.B. mit Trypsin, abspalten. Allerdings deutet ein Experiment mit der β -Untereinheit (Takeda et al., 1985) darauf hin, daß die für das Prozessieren beim Import in die Mitochondrienmatrix verantwortliche Metalloprotease mehrere Spaltstellen erkennen kann. In dem erwähnten Experiment wurde eine durch Nukleotid-Deletion an der Spaltstelle veränderte β -Unterein-

heit importiert, und zwar als größeres Peptid. Dies heißt, daß vor der Endspaltstelle zumindest noch eine andere Position liegt, an der eine Prozessierung erfolgen kann.

Wenn aber trotz des fehlenden N-Terminus das Protein funktionell prozessiert wird und das entstehende Polypeptid zudem noch größer als die eigentliche Untereinheit ist, kann dies nur bedeuten, daß zusätzliche Spaltstellen in der Präsequenz vorhanden sind.

-Ser-Trp-Lys-Arg-Cys-Met-Ala-Ser-Ala-Ala-Gln mutiert zu

-Ser-Trp-Thr-Ala-Gln

Tabelle 15: Sequenzen des Deletionsexperiments. Unterstrichen sind die Aminosäuren, die im reifen Protein gefunden werden.

4. 4. Isolierung und Charakterisierung der Untereinheiten

Die Trennung der Untereinheiten erfolgte mit der HPLC. Dies ist eines der ersten Beispiele (Pevce et al. , 1984) in der Literatur für die erfolgreiche Trennung von Proteinkomplexen mit Hilfe der Reversed phase Technik. Es zeigt die außerordentliche Bedeutung dieser Methode für die Proteinchemie. Alle hier dargestellten Verfahren zur präparativen Trennung von Peptidgemischen bedienen sich der HPLC.

Die Untereinheiten der mitochondrialen F_1 -ATPase haben die Tendenz, in wässriger Lösung Assoziate auszubilden, so daß, wie erwähnt, die Verwendung von denaturierenden Agenzien unumgänglich ist. Im Gegensatz hierzu sind sie bei der Verwendung der in der HPLC gebräuchlichen Lösungsmittel gut löslich. Der Unterschied zwischen der wässrigen und der organisch-wässrigen Phase liegt in der Polarität, d. h. die Assoziation erfolgt hauptsächlich über intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen, die bereits durch Acetonitril aufgehoben werden.

Dieser Unterschied zeigt sich auch im CD-Spektrum. Während von den Untereinheiten in Harnstoff die Spektren völlig ungeordneter Proteine zu finden sind, werden

in Acetonitril /10 mM TFA CD-Spektren erhalten, die einem stark geordnetem Protein entsprechen. Die θ -Werte zeigen zudem, daß das gesamte gelöste Protein einheitlich strukturiert ist.

Auch das Verhalten bei der HPLC spricht für eine der nativen Struktur ähnlichen Konformation. Das δ - ϵ - bzw. das γ - δ - ϵ - Addukt deuten darauf hin, daß im Kontakt mit dem Laufmittel eine Reorganisation der in Harnstoff vollkommen entfalteten Untereinheiten stattfindet. Es ist bekannt, daß die γ -Untereinheit von *E. coli* ϵ bindet (die bakterielle ϵ -Untereinheit entspricht der mitochondrialen δ -Untereinheit) (Dunn, 1981). Durch cross-linking-Experimente an nativer F_1 -ATPase (Todd und Douglas, 1981) wurde gezeigt, daß mitochondriales γ die ϵ -Untereinheit bindet. Das bedeutet, daß diese Addukte reellen Untereinheitenkomplexen entsprechen und die Organisation der Untereinheiten unter physiologischen Bedingungen widerspiegeln können.

In der Umfaltung der Untereinheiten könnte auch der Grund liegen, warum die Ausbeuten bei der HPLC so gering sind. Bei Proteinen allein schon von der Größe eines α_2 -Addukts, das nach der Dissoziation eines hochmolekularen Assoziats zu erwarten ist, sind die hydrophoben Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix so stark, daß Acetonitril als Elutionsmittel nicht ausreicht.

Eine Einstufentrennung eines Proteinkomplexes, wie sie im Falle der Hefe- F_1 -ATPase gelungen ist, sollte auch die Untereinheitenzusammensetzung des Komplexes widerspiegeln. Allerdings kann wegen der geringen Ausbeute die Stöchiometriefrage nicht sicher beantwortet werden. Da bei einem Molekulargewicht der F_1 -ATPase von 380 kDa (Catterall et al. , 1973; Merchant und Selman, 1985) nur eine Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ oder $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2\epsilon_2$ möglich ist, favorisieren die erhaltenen Ergebnisse eindeutig die erste Möglichkeit, auch wenn der Gehalt an den kleineren Untereinheiten zu gering ist. Dieses Resultat bestätigt damit die bereits vorher bestimmte Stöchiometrie für das Hefe-Enzym (Gregory und Hess, 1981).

Die Untereinheiten sind durch eine sehr einfache Aminosäurezusammensetzung charakterisiert. Der Gehalt an biosynthetisch aufwendigen Aminosäuren ist sehr gering,

Trp z. B. wird in der β -Untereinheit, d. h. in einem Enzym von über 500 Aminosäuren, gar nicht verwendet, Cys nur im Precursor.

Die isoelektrische Fokussierung zeigt, daß als Reinheitskriterium für ein Protein weit mehr als ein einheitliches SDS-Gel benötigt wird, wie gerade das Beispiel der α -Untereinheit deutlich vor Augen führt. Auch in ihren isoelektrischen Punkten sind die F_1 -Untereinheiten sehr unterschiedlich; sie umspannen immerhin 6 pH-Einheiten. Auffallend ist, daß die extremen pI's den kleinsten Untereinheiten zugeordnet sind. Bei ϵ , mit einem pI > 10, kann die Ursache eine starke Wechselwirkung mit der Phospholipidmembran oder einer stark sauren Untereinheit des Gesamtkomplexes sein. Daß dies die δ -Untereinheit ist, scheint unwahrscheinlich, da bisher kein wirklicher Hinweis für einen derartigen Kontakt gefunden wurde. Warum δ , das auch an F_0 bindet, derartig sauer ist, ist unklar.

4.5. Sekundärstrukturvorhersage

Bisher sind einschließlich der Hefesequenz 5 Primärstrukturen der γ -Untereinheiten bekannt, 3 bakterielle (*R. rubrum*, Falk et al. , 1985, *R. blastica*, Tybulewicz et al. , 1984 und *E. coli*, Walker et al. , 1984) sowie zwei mitochondriale (Rinderherz, Walker et al. , 1985 sowie *S. cerevisiae*). Um die Sequenzen vergleichen zu können, wurde eine Zuordnung gewählt, die im Wesentlichen der von Walker et al., 1985 entspricht. Alle im Nachfolgenden erwähnten Sequenzpositionen beziehen sich auf die entsprechende Position innerhalb der Zuordnung und nicht auf eine individuelle Position innerhalb der Sequenz.

Alle γ -Untereinheiten haben in etwa die gleiche Länge, nämlich 299 bis 272 Aminosäuren. Allerdings sind lediglich 13,6 % aller Aminosäuren innerhalb der 5 bekannten Sequenzen konserviert. Selbst zwischen den beiden mitochondrialen Untereinheiten findet sich nur 40 % Identität. Interessant ist die Verteilung der homologen Regionen: während der N-terminale (ca. 40 Aminosäuren) und der C-terminale Bereich (ca. 60 Aminosäuren) starke Homologie in allen 5 Untereinheiten aufweist, ist der zen-

trale Bereich sehr viel variabler, bis auf eine Ausnahme: rund 20 Aminosäuren um das zentrale Cys sind sehr stark konserviert.

Wenn also offenbar große Bereiche der Primärstruktur während der Evolution erhalten blieben und zudem kaum größere Insertionen auftreten außer der Insertion in R.rubrum etwa zwischen Position 200-210, so sollte auch die Sekundärstruktur konserviert sein, so daß durch einen Vergleich der Sekundärstrukturvoraussagen ein Erkennen der Strukturelemente möglich sein sollte.

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Strukturbeschreibung ist die Frage, ob sich ein gewisser Bereich der Aminosäurekette in Kontakt mit der wässrigen Phase oder im Inneren des Moleküls befindet. Bei dieser Analyse ist die Betrachtung der Hydropathie (Kyte und Doolittle, 1982) hilfreich. Stark negative Hydropathiewerte lassen nur eine Lokalisation an der Kontaktfläche zum wässrigen Medium zu, während stark positive Hydropathiewerte darauf hindeuten, daß sich dieses Strukturelement entweder im Inneren der Untereinheit oder bei einem Enzymkomplex an der Kontaktfläche zwischen zwei Untereinheiten befindet.

Die nachfolgende Analyse soll zeigen, daß die getroffenen Annahmen berechtigt sind und daß tatsächlich einige strukturelle Eigenheiten gezeigt werden können. Ziel dieser Analyse kann es nicht sein, die gesamte Sekundärstruktur oder gar die Tertiärstruktur vorherzusagen; sie soll vielmehr helfen, die essentiellen Bereiche und Strukturen zu erkennen und dadurch möglicherweise die Funktion der Untereinheit besser zu verstehen.

Tabelle 16 zeigt die Zusammenfassung der Hydropathie- und Sekundärstrukturanalyse.

1	11	21	31	41
MASLKDLRSR	ITSVKSTQKI	TSAMKMVAAS	RLRRAQDTAE	AARPYTORME
MPSLKDLKNR	IGSVKNIRKI	TKAMQMVAAS	KLPPAQDSAE	AARPYTORME
MAGAKEIRSK	IASVQNTQKI	TKAMEMVAAS	KMRKSQDRMA	ASRPYETMR
ATLKDITRR	LKSIKNIQKI	TKSMKMVAAS	KYARAERELK	PARVY
ATLKEVEMR	LKSIKNIEKI	TKTMKIVAST	RLSKAEKAKI	SAK FMDEAE

A		A		A		
hhhhhhh		h hhhhhhhhhh	hhhhhhhhhhh	hh	hhhh	
=====	=====	====+++++	-----	=====	=====	

51	61	71	81	91
RMIGNLAAST	AGMAGASPLL	GGTGKDNVHL	IVALTANRGL	CGGFNGSIRR
AVIASLASGQ	G AGAPRL	AGNGRDQIHI	LVTMTSERGL	CGGFNSTIVR
KVIGHLAHGN	LEYKHPYL	EDRDVKRVGY	LVV STDRGL	CGGLNINL FK
GVGSLALYE	KADI KTP	EDKKK HL	IIGVSSDRGL	CGAIHSSVAK
QLFYKNAETK	NLDVEATETG	APPLE RK EL	IVAITSDKGL	CGSINGSLAK

		A		
hh	tttt h	hhhhhh	tttt	BBB BBBBtttt
ttttttt				
++++	=====	-----++	+++++--=	++++=++++

101	111	121	131	141
ATRTLVBRELE	AQGKTVKLLC	IGKKGR DGL	KREFFPKQIIG	GIADQSSKAI
LARQRANELV	AQGKTVKILT	VGKKGR EQL	KRDWASAFVG	HVDLSDVRR
KLLAEMKTWT	DKGVQCDLAM	IGSKGV SFF	NSVGGNVV	AQVTGMGDNP
QMKSEANLA	AAGKEVKIIG	VGDKIR SIL	HRTHSDQFLV	TFKEVGRRPP
AVRRHLNDQP	ADIVTIKVIG	IGDKIKMQSV	MRTHPNNIKL	SINGIGKAP

	A	A		A
	BBBBBBB	tttt	ttttBBB	BBBBtttttt
=====	=====++++	+-----	-----++	++++=====

151	161	171	181	191
GFSDADRFSS	LILDMFQAGE	FDVCTLVYNR	FQSAISQVVT	RQQIIPFAVP
GYSNAQGIAR	EVLAAFEAGE	ADVVTIFYNR	FQSVISQVPT	AQQVIPA
SLSELIGPVK	VMLQAYDEGR	LDKLYIVSNK	FINTMSQVPT	ISQLLPLPA
TFGDASVIAL	ELLNSGYEFD	EGSIIF NR	FRSVISYKTE	EKPIFSLD
TFQESALIAD	KLLQVMKAGT	YPKISIFYND	PVSSLSFEPS	EKPIFIFAK

	A	A		A
tt	hhh	hhhhhhhh	tttttttt	tttttttt
++++	++++	=====	+++++--	-----++

201	211	221	231	241
TTVAAGNDND	RTAGPKAIYE	YEPSEEEILA	DLLPKNVAIQ	VFRGMLESFA
KF	EEAETNALYD	YEPSEEAILA	DLLPRGVATQ	IFTALLENAA
SDDD	DLKHKSWDYL	YEPDPKALLD	TLLRRYVESQ	VYQGVVENLA
	TISSAESMSI	YDDIDADVLR	NYQEYSIANI	IYYSLKESTT
T	IEQSPSFGWF	EIDTDANVPR	DLFEYTLANQ	MLTAMAQLYA
	ttttt	tttthhhhhh	hhhttttßßßß	ßßßhhhhhhh
-	-----	----	----	+++
251	261	271	281	291
SEQGARTAM	DNATRNAGDM	IKKLSLTYNR	TRQAQITKEL	IEIISGAEL
SEQGARMSAM	DNATRNAGDM	INKLTIQYNR	SRQAAITKEL	IEIISGAEL
SEQAARMVAM	KAATDNGGSL	IKELQLVYNK	ARQASITQEL	TEIVSGAAAV
SEQSARTAM	DNASKNASEM	IDKLTLTfNR	TRQAVITKEL	IEIISGAAAL
AEISARRNAM	DNASKNAGDM	IRKYSILYNR	TRQAVITNEL	VDIITGASSLG
	A A	AA		
hhhhhhhhhh	hhhhhttttt	ßßßßßtt	tthhhhhhhh	hhhhhtttt
-----	=====	=====	=====	+++++++

Tabelle 16: Sekundärstrukturvorhersage der γ -Untereinheiten

h : α -Helix - : hydrophil

β : β -Faltblatt + : hydrophob

t : turn = : neutral bzL. der Hydropathie

A : Austausch Asp, Glu gegen Lys, Arg

bei allen anderen Positionen kann keine gemeinsame Zuordnung getroffen werden. Die Sequenzen sind (in der Reihenfolge) von R. rubrum, R. blastica, E.coli, Rinderherz und Hefe.

Auffällig beim Vergleich der Sequenzen ist die relative Häufigkeit von Austauschbasen gegen saure Aminosäuren: nach Dayhoff (Dayhoff et al. , 1972) ist dies im Inneren eines Proteins ein sehr unwahrscheinlicher Austausch, da dazu eine simultane Punktmutation in zwei Bereichen erfolgt sein muß, nämlich in der betrachteten Position sowie an der dazugehörigen Gegenladung. Die Stellen eines Proteins, an denen Substitutionen dieser Art erfolgen, liegen daher am wahrscheinlichsten an der Oberfläche eines Protein. Das heißt, die Positionen 8, 25, 76, 117, 123, 148, 160, 161,

170, 180, 261, 265, 272 und 273 sollten sich an der Oberfläche befinden. Die Austauschpositionen sind in Abbildung 15 markiert.

Vergleicht man die Hydropathien der Aminosäuren innerhalb der einzelnen Untereinheiten, so ergeben sich deutlich homologe Bereiche. So sind z. B. die Aminosäuren in Position 24-30, 51-55, 78-85, 90-100, 116-122, 137-144, 157-164, 174-178, 183-187, 193-200, 273-278 sowie 291-301 in einer stark hydrophoben Umgebung. Dies legt die Vermutung nahe, daß diese Regionen sich entweder im Innerern des Proteins oder an den Kontaktflächen zu den anderen Untereinheiten befinden. Ähnliche Bereiche findet man auch für hydrophile Aminosäuregruppen. Dies sind insbesondere die Aminosäuren in den Positionen 31-39, 43-50, 73-77, 123-135, 179-182, 206-214, 221-226, 251-256, 262-268 und 279-283.

Neben diesen eindeutig zuzuordnenden Bereichen, bei denen auch eine direkte topographische Eingliederung möglich ist, finden sich auch Bereiche, bei denen keine direkte Einordnung möglich ist. In den meißten dieser Bereiche liegen die Hydropathien so nahe am Mittelwert, daß keine sichere Klassifizierung getroffen werden kann.

Bei der Auswertung der Hydropathie wurde eine Schrittweite von 5 gewählt, d. h. , die ermittelten Hydropathien berücksichtigen jeweils die zwei vorangehenden und nachfolgenden Aminosäuren. Diese Art der Auswertung ermöglicht es, signifikant turn-Regionen zu erkennen, die im allgemeinen durch die Anwesenheit kleiner, hydrophiler Aminosäuren gekennzeichnet sind. So werden z. B. bei der Sekundärstrukturvorhersage die Regionen 87-90 oder 179-182 als turn-Strukturen vorhergesagt, was sich deutlich in der größeren Hydrophilizität zeigt. Allerdings sind die Hydropathievorhersagen im Vergleich zur Sekundärstruktur um üblicherweise eine Position verschoben. Diese Verschiebung resultiert daraus, daß bei der Hydropathie als mittelndem Verfahren die ersten Positionen durch die vorhergehenden Aminosäuren beeinflußt sind, was sich insbesondere bei einem Wechsel hydrophob zu hydrophil bemerkbar macht. Da bei der Sekundärstrukturvorhersage immer nach Nukleationspunkten im Inneren eines Strukturelements gesucht wird, erklärt sich hierdurch die Verschiebung. Diese Analyse zeigt auch, daß die oben getroffene Annahme in Bezug auf die Aminosäureaustausche im

wesentlichen richtig war. Fast alle Austausche erfolgen in Regionen geringerer Hydrophobizität. Lediglich die Positionen 25, 117 und 160, 161 liegen in einem stark hydrophoben Bereich, 25 und 117 jeweils am Anfang einer Helix bzw. β -Struktur. Nur die Aminosäuren in Position 160, 161 befinden sich im Inneren einer stark hydrophoben Umgebung.

Es muß in diesem Zusammenhang auch gesagt werden, daß in diesem Vergleich aller 5 bekannten Sequenzen der γ -Untereinheiten manche Bereiche völlig unterschiedliche Hydrophobizitäten zeigten, die keinerlei Zuordnung erlaubten.

Die Analyse der Sekundärstrukturvorhersage wurde ebenfalls als Vergleich der bekannten Sequenzen durchgeführt. Das verwandte Rechnerprogramm (Rawlings et al., 1983; Dzionara et al., 1977) umfasste die Vorhersagemethoden nach Scheraga (Burgess et al., 1974), Chou & Fasman (1978, 1979), Nagano (1977) und Robson und Suzuki (1976). Als signifikante Vorhersagen wurden nur diejenigen Vorhersagen betrachtet, die in allen Sequenzen als wahrscheinlich prognostiziert wurden. Daher werden eine Reihe von Bereichen nicht zugeordnet, auch in den homologen Teilen der Sequenzen. Meist jedoch ist die Übereinstimmung so groß, daß die Vorhersagen als signifikant angesehen werden können.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die γ -Untereinheit eine Sekundärstruktur mit einem hohen Anteil an geordneten Strukturelementen wie Helix oder Faltblatt aufweist. Dies wurde ja schon durch die Auswertung der CD-Spektren deutlich. Und obwohl durch die Sekundärstrukturauswertung sicherlich ein Teil der Strukturelemente nicht in allen Sequenzen erkannt wird, lassen sich durch diese Analyse einige Rückschlüsse auf den Aufbau dieser Untereinheit ziehen. Die große Unsicherheit bei der Zuordnung der hydrophoben Elemente liegt darin, daß nicht vorhergesagt werden kann, ob das betreffende Segment Teil der Kontaktflächen zu den anderen Untereinheiten ist oder sich im Inneren der Untereinheit befindet.

Abbildung 14 versucht, schematisch die Position der identifizierten Strukturelemente darzustellen.

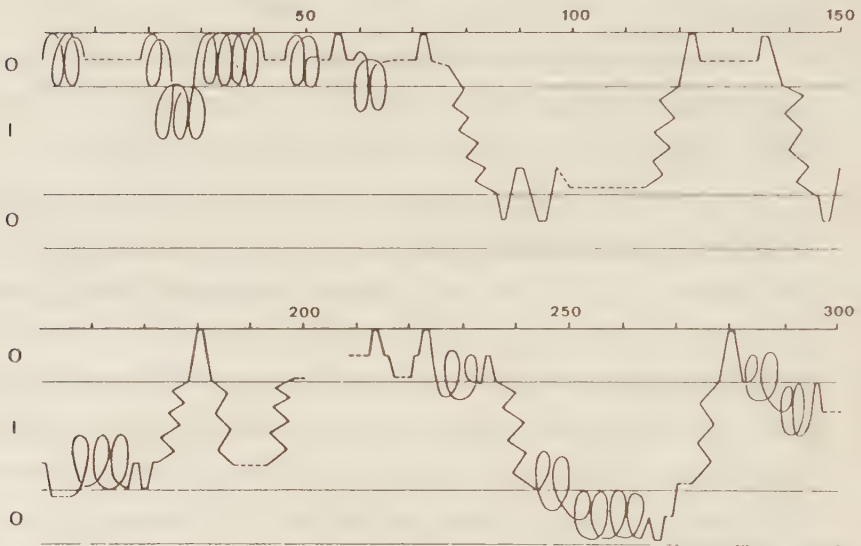


Abbildung 14 ; Zuordnung der Strukturelemente zur Position innerhalb der γ -Untereinheit. O und I bedeuten eine Lokalisation an der Oberfläche bzw. im Inneren des Proteins, die Zeichnung zeigt die Verteilung der Helices, β -Strukturen und der turn-Regionen.

Diese Darstellung bedarf noch zusätzlicher Erläuterungen. Ziel dieser Darstellung ist es, die Lokalisation der Strukturelemente in ihrer Position sowohl innerhalb der Primärstruktur als auch innerhalb des Proteins anzugeben, allerdings nur unter dem Gesichtspunkt, ob sich das Strukturelement an der Oberfläche oder im Innern des Proteins befindet. Auf keinen Fall soll hier versucht werden, eine dreidimensionale Anordnung der wesentlichen Strukturen zu geben.

Vorhergesagt wird in diesem Vergleich ein α -Helix-Gehalt von 34 %. Da aber nur die Konsensussequenzen zugeordnet werden, werden manche Bereiche nicht identifiziert, obwohl eindeutige Vorhersagen für einzelne Untereinheiten vorliegen. Die eindeutigste dieser Regionen ist der Bereich 98-110, für den für die zwei mitochondrialen und das E. coli-Protein eine α -Helix vorhergesagt wird, während in den zwei anderen Untereinheiten teilweise eine β -Struktur prognostiziert wird. Berücksichtigt man diesen Bereich ebenfalls, so ergibt sich aus der Sekundärstrukturvorhersage folgende Anteile an der Gesamtstruktur:

α -Helix : 39 %

β -Struktur : 18 %

turn : 24 %

andere Strukturen haben dementsprechend einen Anteil von 19 %. Diese Resultate entsprechen sehr gut den Vorhersagen aus der CD-Analyse, die ja einen α -Helix-Gehalt von 40 %, einen Faltblattanteil von 15 % und einen turn-Gehalt von 20 -30 % ergaben.

Auffallend ist die Anordnung der β -Stränge. Insgesamt werden 8 β -Stränge erkannt, alle zumindest einseitig flankiert von turn-Strukturen. Da solche Faltblätter stark stabilisierende Strukturen darstellen, können sie im Inneren des Proteins anzutreffen sein, wie dies z. B. bei der Adenylat-Kinase (Schulz et al. , 1974) der Fall ist. Häufig bilden solche Faltblätter aber auch Kontaktstellen zu anderen Untereinheiten, da durch die Verlängerung des Faltblatts sehr stabile Strukturen entstehen. Die Frage, ob ein β -Strang sich im Inneren oder an einer Kontaktstelle befindet, kann hier nicht geklärt werden, die vorliegende Arbeit kann jedoch als Arbeitsgrundlage dienen, um gezielt nach diesen Kontaktstellen zu suchen.

Von besonderer Bedeutung scheint auch die Region um das zentrale Cys zu sein. Zwar läßt sich das Cys in manchen ATPasen ohne Aktivitätsverlust modifizieren (Senior, 1973; Godinot et al., 1975), während bei anderen F_1 -ATPasen, insbesondere bei pflanzlichen ATPasen das freie Thiol in der γ -Untereinheit absolut notwendig für ein aktives Enzym ist (Nalin und McCarty, 1984). Doch unabhängig von der inhibierenden Eigenschaft des Cys machen bereits seine stark konservierte Position sowie die

Strukturvorhersage, daß hier eine Region von mehreren aufeinanderfolgenden turns vorliegt, diese Region besonders interessant. Im Gegensatz zu allen anderen turns in der γ -Untereinheit bestehen diese Umkehrregionen um das Cys vorwiegend aus hydrophoberen Aminosäuren. Da die drei Cysteine der F_1 -ATPase im intakten Enzym als freie Thiole vorliegen und sich bei der Trennung der Untereinheiten auch nur partiell Dimere bilden, müssen diese Cys im Inneren der Untereinheiten zu finden sein, allerdings nicht zu weit von der Oberfläche entfernt. Genau dies sagt auch die Strukturvorhersage: der turn um das Cys ist hydrophob, kann aber mit einigen Resten (Asn 95) in die Nähe des wässrigen Mediums reichen.

Bei der Beschreibung der Strukturelemente fällt auf, daß alle β -Stränge überwiegend aus ungeladenen Resten bestehen. Dies bedeutet, daß sie sich im Inneren des Proteinkomplexes F_1 -ATPase befinden müssen (Lim, 1974), da kaum eine Salzbrückenstabilisierung erfolgen kann, im Gegensatz zu den Helices. Die vorhergesagte helikalen Regionen sind nach der Hydropathie überwiegend hydrophil, bedingt durch ihren hohen Anteil an geladenen Aminosäuren - rund 30 % aller Aminosäuren in den Helices im Hefeprotein sind geladen - die Anordnung der Aminosäuren in den Helices ist auch amphipatisch, aber nur in wenigen Fällen liegt ein typisches $i, i+4$ oder $i, i+3$ Ionenpaar vor. Dies bedeutet, die Helices sind überwiegend in Kontakt mit der wässrigen Phase.

Insgesamt läßt sich die Struktur folgendermaßen beschreiben: Das Innere des Moleküls wird gebildet durch hydrophobe β -Strukturen, die das gesamte Molekül durchspannen und zumindest an einer Seite durch einen hydrophilen turn terminiert sind, sowie partiell durch die turn-Region um das zentrale Cys, während sich die α -Helices an der Oberfläche befinden.

Obwohl niemals eine Nukleotidbindungsstelle in der γ -Untereinheit gefunden wurde, ähnelt die vorhergesagte Sekundärstruktur stark den identifizierten Nukleotidbindungstellen anderer ATP-bindender Proteine (Richardson, 1981; Walker et al., 1982). Alle diese Stellen sind gekennzeichnet durch ihr System von Rosman-Faltungen und einen Gly-reichen Bereich, ähnlich dem um das Cys in der γ -Untereinheit.

Da aber ein Faltblatt aus 6 Strängen bereits 25 Å breit ist, können sich zwei der 8 Stränge nicht im Inneren des Moleküls befinden; sie sollten vielmehr Teil einer Kontaktstelle zu den anderen Untereinheiten sein. Eine weitere Kontaktstelle ist wahrscheinlich die hydrophobe Helix im N-terminalen Bereich, deren Deletion zu einer nicht assemblierbaren ATPase führt (Kanazawa et al., 1985).

Leider ermöglicht die hier durchgeführte Analyse nicht, die Kontaktstelle zu identifizieren. Es können nur Bereiche genannt werden, die potentiell dazu in der Lage sind.

Auch die Verteilung der geladenen Aminosäuren ergibt keinen Ansatzpunkt zur Identifizierung der Kontaktstellen zu den übrigen Untereinheiten. Konserviert sind im wesentlichen positiv geladene Aminosäuren, sie sind überwiegend im N- und C-terminalen Bereich lokalisiert.

Die Verteilung sowohl der hydrophoben Regionen als auch der geladenen Aminosäuren läßt allerdings einen Schluß zu: da weder hinsichtlich der hydrophoben Bereiche noch in Bezug auf die ionischen Aminosäuren mehrere untereinander homologe potentielle Bindungsstellen zu finden sind, können auch nicht zwei oder drei $\alpha\beta$ -Paare in direktem Kontakt mit der γ -Untereinheit sein. Dies bedeutet, daß die Struktur der F_1 -ATPase auch nach diesem Ergebnis der elektronenmikroskopischen Aufnahme (s. Seite 3) entspricht. Zusammen mit der Ähnlichkeit der γ -Untereinheit mit Nukleotid-bindenden Enzymen könnte diese Untereinheit möglicherweise Teil der eigentlich enzymatisch aktive Spezies sein: nur wenn ein an α und β gebundenes Nukleotid in Kontakt mit der γ -Untereinheit kommt, kann eine Katalyse erfolgen.

4. 6. Abschließende Bemerkungen

Die vorliegenden Ergebnisse können einen Schritt zum besseren Verständnis der F_1 -ATPase aus Hefe, und, da es sich hierbei um ein sehr stark konserviertes Enzym handelt, allgemein aller F_1 -ATPasen bilden.

Der Vorteil der Ein-Stufen-Trennung der Untereinheiten mit Hilfe der HPLC liegt nicht nur in der Schnelligkeit, mit der die Untereinheiten in reiner Form erhalten werden können, sondern insbesondere in der schonenden Behandlung der Peptide, welche es ermöglicht, zum ersten Mal eukaryotische F_1 -Untereinheiten unter nicht völlig denaturierenden Bedingungen zu isolieren.

Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, durch homologe, aber auch heterologe Rekonstitution eine intakte eukaryotische ATPase zu regenerieren, wodurch Informationen über Art und Lokalisation der Protein-Protein-Kontaktstellen zugänglich würden, sei es durch monoklonale Antikörper, durch limitierte chemische Modifikation oder bei heterologen ATPasen über mutierte bakterielle Untereinheiten. Die Rekonstitution einer intakten ATPase bietet daneben natürlich auch die Möglichkeit, direkt Informationen über die Funktion der Untereinheiten zu erhalten.

Ein weiterer Weg zum Verständnis der ATP-Synthetase liegt darin, daß nun die Primärstruktur der kleinen Untereinheiten ϵ und δ ermittelt werden kann. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist über deren Bedeutung sehr wenig bekannt; ein Homologievergleich kann auch bei diesen Untereinheiten helfen, ihre Struktur und möglicherweise funktionelle Aspekte klarzumachen.

Die potentiellen Möglichkeiten einer Sekundärstrukturvorhersage unter Berücksichtigung anderer homologer Proteine, also unter Anwendung eines Minimalmodells für die Sekundärstruktur, konnte für die γ -Untereinheit demonstriert werden, so daß auch bei den kleinen Untereinheiten aus dem Primärstrukturvergleich für die Struktur oder die Funktion wichtige Sequenzbereiche erkannt werden können.

Insgesamt bietet sich durch die vorliegenden Ergebnisse die Möglichkeit, auch auf proteinchemischen Weg weitere Einzelheiten zum Verständnis der ATP-Synthese beizutragen.

5. Zusammenfassung

Durch die Verwendung der HPLC konnten in einer Einstufentrennung alle Untereinheiten der F_1 -ATPase aus Reinstamm-Hefe isoliert werden. Einige molekulare Daten der isolierten Untereinheiten wie die CD-Spektren, die isoelektrischen Punkte, die Molekulargewichte, die Aminosäurezusammensetzung und die N-terminalen Sequenzen wurden bestimmt.

Diese Sequenzen zeigten als wichtigstes Reinheitskriterium, daß die α -Untereinheit N-terminal an diskreten Stellen proteolytisch gespalten wird, offenbar ohne ihre physiologische Funktion zu verlieren. Zum anderen sind diese Sequenzen die einzige Möglichkeit, die Größe eines reifen, importierten Proteins aus der DNA-Sequenz zu ermitteln. So konnten die exakten Molekulargewichte der α - und β -Untereinheit mit der bekannten DNA-Sequenz bestimmt werden, wobei Diskrepanzen zwischen den Literaturdaten und den tatsächlichen Spaltstellen auftraten.

Das exakte Molekulargewicht der γ -Untereinheit ist durch die proteinchemische Sequenzanalyse bestimmt worden. Diese Aminosäuresequenz ermöglicht es, durch Homologievergleich mit den Primärstrukturen der anderen bekannten γ -Untereinheiten ein Modell über die Zuordnung von Strukturen hinsichtlich ihrer Lokalisation im Protein zu treffen. Das Innere des Proteins wird hiernach aus einem β -Faltblatt mit 5-6 Strängen gebildet, während 2-3 β -Stränge eine Kontaktstelle zu einer anderen Untereinheit bildet. Da keine wiederkehrenden Strukturen gefunden wurden, favorisiert diese Strukturvorhersage die Vorstellung, daß nur eine Bindungsstelle des $\alpha\beta$ -Trimers an die γ -Untereinheit vorhanden ist.

Literatur

1. Akey, C. W. , Crepeau, R. H. , Dunn, S. D. , McCarty, R. E. und Edelstein, S. J. ,
EMBO J. 2 1409-1415 (1983)
2. Begusch, H. , Dissertation Bochum (1980)
3. Boekema, E. J. , Berden, J. A. und van Heel, M. G. , Bioc. Biop. Acta 851 353-360
(1986)
4. Boyer, P. D. , Cross, R. L. und Momsen, W. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 2837-
2839 (1973)
5. Brahms, S. und Brahms, J. , J. Mol. Biol. 138 149-178 (1980)
6. Burgess, A. W. , Ponnuswamy, P. K. und Scheraga, H. A. , Israel J. Chem. 12 239-
286 (1974)
7. Catterall, W. A. , Coty, W. A. und Pedersen, P. L. , J. Biol. Chem. 248 7427-7431
(1973)
8. Chang, C. T. , Wu, C. S. C. und Yang, J. T. , Anal. Bioc. 91 13-31 (1978)
9. Chen, Y. H. , Yang, J. T. und Chau, K. H. , Biochem. 13 3350-3359 (1974)
10. Chou, P. Y. und Fasman, G. D. , Adv. Enzymol. 47 45-148 (1978)
11. Chou, P. Y. und Fasman, G. D. , Biophys. J. 26 367-384 (1979)
12. Compton , L. A. und Johnson, W. C. , jr. , Anal. Bioc. 155 155-167 (1986)
13. Crestfield, A. M. , Moore, S. und Stein, W. H. , J. Biol. Chem. 238 622-627 (1963)
14. Cross, R. L. und Boyer, P. D. , Biochem. 14 392-398 (1975)
15. Cross, R. L. , Cunningham, D. und Tamura, J. K. , Curr. Top. Cell. Reg. 24 335-343
(1984)
16. Danon, A. und Stoeckenius, W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 1234-1238 (1974)
17. Dayhoff, M. O. , Eck, R. V. und Park, C. M. , in: Atlas of Protein Sequence and
Structure, 89-99, Dayhoff, M. O. (Edit.), National Biomedical Research
Foundation (1972)
18. Drapeau, G. R. , Meth. Enzymol. 47 189-191 (1977)
19. Dunn, S. D. , J. Biol. Chem. 257 7354-7359 (1981)
20. Dunn, S. D. und Heppel, L. A. , Arch. Bioc. Biop. 210 ,421-436 (1981)

21. Dzionara, M. , Robinson, S. M. L. und Wittmann-Liebold, B. , Hoppe-Seylers
Z. Physiol. Chem. 358 1003-1919 (1977)
22. Edelhoch, H. , Biochem. 6 1948-1954 (1967)
23. Falk, G. , Hampe, A. und Walker, J. E. , Biochem. J. 228 391-407 (1985)
24. Feldman, R. I. und Sigman, D. S. , J. Biol. Chem. 257 1676-1683 (1982)
25. Fergusson, S. J. , Lloyd, W. J. , Lyons, M. H. und Radda, G. K. , Eur. J. Bioc. 54
117-126 (1975)
26. Foster, D. C. und Fillingame, R. H. , J. Biol. Chem 257 2009-2015 (1982)
27. Fry, D. C. , Kuby, S. A. und Mildvan, A. S. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 907-911
(1986)
28. Gasser, S. M. , Daum, G. und Schatz, G. J. , Biol. Chem. 257 13034-13041 (1982)
29. Gerber, G. E. und Khorana, H. G. , Meth. Enzym. 88 56-74 (1982)
30. Godinot, C. , Di Pietro, A. und Gautheron, D. C., FEBS Lett. 60 250-255 (1975)
31. Gómez Maqueo de Covarrubias, M. Y. , Diss. Bochum (1984)
32. Gómez Puyou, A. , Tuena de Gómez Puyou, M. und de Meis, L. , Eur. J. Biochem.
159 133-140 (1986)
33. Gregory, R. und Hess, B. , FEBS Lett. 129 210-214 (1981)
34. Hennessey, J. P. , jr. und Johnson, W. C. , jr. , Biochem. 20 1085-1094 (1982)
35. Hoppe, J. und Sebald, W. , Bioc. Biop. Acta 768 1-27 (1984)
36. Issartel, J. P. , Lunardi, J. und Vignais, P. V. , J. Biol. Chem. 261 895-901 (1986)
37. Jallon, J. M. , Spyridakis, A. und Cosson, J. , Biochimie 59 869-875 (1977)
38. Kagawa, Y. , Bioc. Biop. Acta 505 45-93 (1978)
39. Kanazawa, H. , Hama, H. , Rosen, B. P. und Futai, M. , Arch. Bioc. Biop. 241 364-
370 (1985)
40. Kasahara, M. und Penefsky, H. S. , J. Biol. Chem. 253 4180-4187 (1978)
41. Knowles, A. und Penefsky, H. S. , J. Biol. Chem. 247 6624-6630 (1972)
42. Kyte, J. und Doolittle, R. F. J. , Mol. Biol. 157 105-132 (1982)
43. Lämmli, U. K. , Nature 227 680-685 (1970)
44. Lim, V. I. , J. Mol. Biol. 88 857-872 (1974)
45. Lötscher, H. R. und Capaldi, R. A. , Bioc. Biop. Res. Comm. 121 331-339 (1984)

46. Lübben, M. , Lücken, U. , Weber, J. und Schäfer, G. , Eur. J. Bioc. 143 483-490 (1984)
47. Mahoney, W. C. und Hermodson, M. A. , Biochem. 18 3810-3814 (1979)
48. Manavalan, P. und Johnson, W. C. , jr. , Proc. Int. Symp. Biomol. Struct. Interactions, Suppl. J. Biosci. 8 141-149 (1985)
49. Mayer, F. , Mack Ivey, D. und Ljungdahl, L. G. , J. Bact. 166 1128-1130 (1986)
50. Mc Ada, P. C. und Douglas, M. G. , J. Biol. Chem. 257 3177-3182 (1982)
51. Merchant, S. und Selman, B. R. , Photosynth. Rep. 6 3-31 (1985)
52. Mitchell, P. , Nature 191 144-148 (1961)
53. Mitchell, P. , Biol. Rev. 41 445-502 (1966)
54. Mitchell, P. , FEBS lett. 176 287-294 (1984)
55. Nagano, K. , J. Mol. Biol. 109 251-274 (1977)
56. Nalin, C. M. und McCarty, R. E. , J. Biol. Chem. 259 7275-7280 (1984)
57. Nelson, N. , Bioc. Biop. Acta 456 314-338 (1976)
58. Penefsky, H. S. , Adv. Enzymol 49 223-260 (1979)
59. Penefsky, H. S. , J. Biol. Chem. 260 13735-13741 (1985)
60. Pevec, B. , Fassold, E. , Uwira, N. und Hess, B. , EBEC Reports 3 351-352 (1984)
61. Pullman, M. E. , Penefsky, H. S. , Datta, A. und Racker, E. , J. Biol. Chem. 235 3322-3329 (1960)
62. Rawlings, N. , Ashman, K. und Wittmann-Liebold, B. , Int. J. Protein Res. 22 515-524 (1983)
63. Reckenwald, D. und Hess, B. , Bioc. Biop. Acta 592 377-384 (1980)
64. Reid, G. A. , Curr. Topics Membr. Transp. 24 295-336 (1985)
65. Richardson, J. S. , Adv. Protein Chem. 34 167-339 (1981)
66. Robson, B. und Suzuki, E. , J. Mol. Biol. 107 327-356 (1976)
67. Ryrie, I. J. , Arch. Bioc. Biop. 184 464-475 (1977)
68. Saltzgaber-Muller, J. , Kunapuli, S. P. und Douglas, M. G. , J. Biol. Chem. 258 11465-11470 (1983)
69. Saxena, V. P. und Wetlaufer, D. B. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 969-972 (1971)
70. Schäfer, G. , in : Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research

(Ouagliariello, E. , edt.) Vol. 1, 191-202 (1985)

71. Schleyer, M. , Schmidt, B. und Neupert, W. , Eur. J. Biochem. 125 109-116 (1982)
72. Schreiber, J. und Witkop, B. , J. Amer. Chem. Soc. 86 2441- (1964)
73. Schulz, G. E. , Elzinga, M. , Marx, F. und Schirmer, R. H. , Nature 250 120-123 (1974)
74. Senior, A. E. , Biochem. 12 3622-3627 (1973)
75. Senior, A. E. , J. Biol. Chem. 254 11319-11322 (1979)
76. Smith, R. L. und Shaw, E. , J. Biol. Chem. 244 4704-4712 (1969)
77. Somlo, M. , Cosson, J. , Clavillier, L. , Krupa, M. und Laporte, I. , Eur. J. Biochem. 122 369-374 (1982)
78. Sone, N. , Hou, C. und Bragg, P. D. , Biochem. Cell Biol. 64 229-237 (1986)
79. Stan-Lotter, H. und Bragg, P. D. , Eur. J. Bioc. 154 321-327 (1986)
80. Stark, G. R. , Stein, W. H. und Moore, S. , J. Biol. Chem. 235 3177-3181 (1960)
81. Stutterheim, L. E. , Hennecke, M. A. C. und Berden, J. A. , Bioc.Biop.Arch. 634 271-274 (1981)
82. Takeda, M. , Vassarotti, A. und Douglas, M. G. , J. Biol. Chem. 260 15458-15465 (1985)
83. Takeda, M. , Chen, W. J. , Saltzgaber-Muller, J. und Douglas, M. G. , J. Biol. Chem. 261 15126-15133 (1986)
84. Takeshige, K. , Hess, B. , Böhm, M. und Zimmermann-Telschow, H. , Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357 1605-1622 (1976)
85. Tarr, G. E. , Methods Enzymol. 47 335-357 (1975)
86. Tarr, G. E. , Analyt. Biochem. 111 27-32 (1981)
87. Tarr, G. E. , in "Methods in Protein Sequence Analysis", Elzinga, M. , (Edit.). 223-232, Humana Press (1982)
88. Tiedge, H. , Schäfer, G. und Mayer, F. , Eur. J. Bioc. 132 37-45 (1983)
89. Todd, R. , Griesenbeck, T. , Mc Ada, P. C. , Buck, M. und Douglas, M. G. , in: The Organisation and Expression of the Mitochondrial Genome (Kroon, A. und Saccone, C. , Edt.) 375-381, Elsevier, Amsterdam (1980)
90. Todd, R. D. und Douglas, M. G. , J. Biol. Chem. 256 6984-6989 (1981)

91. Tybulewicz, V. L.J. , Falk ,G. und Walker, J. E. , J. Mol. Biol. 179 185-214 (1984)
92. Vassarotti, A. , Chen, W. , Smagula, C. und Douglas, M. G. , J. Biol. Chem. 262 411-418 (1987)
93. Walker, J. E., Saraste, M. , Runswick, M. J. und Gay, N. J. , EMBO J. 1 945-951 (1982)
94. Walker, J. E. , Saraste, M. und Gay, N. J. , Bioc. Biop. Acta 768 164-200 (1984)
95. Walker, J. E. , Fearnley, I. M. , Gay, N. J. , Gibson, B. W., Northrop, F. D. , Powell, S. J. , Runswick, M. J. , Saraste, M. und Tybulewicz, V. L. J. , J. Mol. Biol. 184 677-701 (1985)
96. Wang, J. H. , J. Biol. Chem. 260 1374-1377 (1984)
97. Yoshida, M. , Okamoto, H. , Sone, N. ,Hirata, H. und Kagawa, Y. , Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 ,2375-2378 (1977)

Lebenslauf

- | | |
|----------------|---|
| 13.11.1954 | geboren in Herne |
| 1961-1966 | Besuch der Volksschule in Herne-Sodingen |
| 1966-1974 | Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums in Herne |
| WS 1974 | Beginn des Chemie-Studiums an der Ruhr-Universität Bochum |
| SS 1977 | Fortsetzung des Studiums an der Universität Köln |
| 29. 5. 1981 | Diplom mit der Diplomarbeit über das Thema: "Versuche zur Synthese von R- und S-Ectocarpin" |
| seit 1980 | verheiratet mit Hiltrud Dörner, drei Kinder |
| seit Juni 1981 | Arbeit am Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie in Dortmund |

Ich danke Herrn Prof. B. Hess für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. M. Engelhard für die vielen hilfreichen Diskussionen.

Ich danke Herrn Dr. J. Block für die Hilfe bei den Sekundärstrukturberechnungen sowie Frau Prof. B. Wittmann-Liebold für die Überlassung des Rechnerprogramms.

Mein Dank gilt auch Frau B. Wohlgemuth und Frau R. Eichas-Nell für ihre Hilfe und Mitarbeit bei der Durchführung der Arbeit.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts sei gedankt für die gute Zusammenarbeit.

